



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

Caracterización química y evaluación de las actividades antioxidante y antimicrobiana de mieles florales: Naranja, Cactáceas y Campanilla

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta:

M.C. Beatriz Adriana Rodríguez Romero

Dirigido por:

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz

Centro Universitario
Querétaro, Oro.
Abril, 2012
México



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

Caracterización química y evaluación de las actividades antioxidante y antimicrobiana de mieles florales: Naranja, Cactáceas y Campanilla

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta:

M.C. Beatriz Adriana Rodríguez Romero

Dirigido por:

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

SINODALES

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz
Presidente

Firma

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Secretario

Firma

Dr. Octavio Paredes López
Vocal

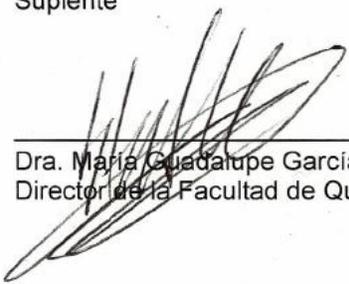
Firma

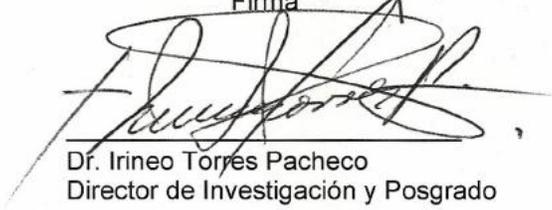
Dr. Eduardo Castaño Tostado
Suplente

Firma

Dra. Isabel Guerrero Legarreta
Suplente

Firma


Dra. María Guadalupe García Alcocer
Directora de la Facultad de Química


Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Abril, 2012
México

Dedicatoria

A mis padres con todo mi corazón, debido a que son mi inspiración. En todos los pasos que doy siento su fuerza, confianza y fe.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

A la **Dra. Sandra Mendoza Díaz**, por su apoyo en la realización de este trabajo, por sus buenos consejos y por la confianza brindada, muchas gracias.

A los sinodales participantes en la revisión y mejora de este trabajo: **Dra. Montserrat Hernández Iturriaga, Dr. Octavio Paredes López, Dr. Eduardo Castaño Tostado y Dra. Isabel Guerrero Legarreta.**

A mis compañeros de laboratorio: **Alma Lazcano, Héctor Pool, y Alexandra Cárdenas, Alma Loubet.**

A mis compañeros del laboratorio de microbiología: **Fernando Ruíz, Martha, Jesús Padilla, Esau Zuñiga.**

Al personal administrativo del PROPAC, por todo su apoyo y su disposición de tiempo y esfuerzo, gracias **Carmelita, Benjamín y Laurita.**

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Mi familia, **Ignacio Rodríguez** mi padre, **Lidia Romero** mi madre, **Rocío y Lina Rodríguez** mis hermanas, siento siempre su apoyo y amor.

A la persona que me acompaña, ama y cree en mí, **Marcelo Hernández**.

A mis amigos, desde el momento en que llegue a esta ciudad me apoyaron y me hicieron sentir en casa: **Ingrid Murrieta Pazos, Alfonso Pérez Gallardo, Joel Gómez, Liliana Rodríguez, Adriana Blanco, Marisol Aceituno, Fanny González y Raquel Castañeda**.

Y a todas las personas que no nombro debido a un descuido u olvido momentáneo, una disculpa porque sé que son importantes y siempre van a estar conmigo apoyándome y queriéndome.

MUCHAS GRACIAS

RESUMEN

La miel es un líquido complejo natural, dulce y viscoso producido por las abejas a partir del néctar de flores y exudados de plantas. Debido a que México posee una gran biodiversidad de plantas las mieles podrían presentar propiedades biológicas relevantes, las cuales se encuentran fuertemente vinculadas con el origen floral. El objetivo del presente trabajo fue dilucidar la responsabilidad de los metabolitos secundarios en las propiedades antioxidante y antimicrobiana de mieles florales mexicanas. Se seleccionó el material biológico en base a la composición química, las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de 14 mieles del centro y sur de México. Se eligió la miel de Campanilla, Cactáceas y Naranja. Se analizó el contenido de prolina, peróxido de hidrógeno y el perfil de compuestos fenólicos y azúcares mediante HPLC. Se investigó el perfil de metabolitos secundarios y la actividad antioxidante antes y después de un proceso de digestión *in vitro*. La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó con seis microorganismos patógenos, se ensayaron la miel, extractos metanólicos, miel con catalasa, peróxido de hidrógeno y un análogo de azúcares. Se identificaron 13 compuestos fenólicos, destacando: catequina, rutina, ácido siríngico y ferúlico. Los azúcares mayoritarios fueron la fructosa y glucosa, seguidos de la maltosa, rafinosa, sacarosa y melibiosa. El contenido de peróxido de hidrógeno fue de 88.33-111.83 ppm hasta 609.68-965.97 ppm después de 34 h. El contenido de prolina fue de 333.88-575.93 mg/kg. La miel de Naranja presentó los mejores resultados para contenido de fenoles totales y actividad antioxidante *in vitro*. Los compuestos responsables de la actividad antioxidante fueron los compuestos fenólicos, los que actuaron donando electrones y reduciendo radicales libres. La miel de Campanilla demostró el mejor índice de bioaccesibilidad y actividad antioxidante después del proceso de digestión *in vitro*. Todas las muestras evaluadas inhibieron el desarrollo de *Bacillus cereus*. El peróxido de hidrógeno jugó un papel muy importante en la actividad antimicrobiana de las mieles evaluadas. Las mieles mexicanas evaluadas poseen actividad antioxidante y antimicrobiana, debida principalmente a los compuestos fenólicos y el peróxido de hidrógeno.

(Palabras claves: mieles florales, composición química, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana)

SUMMARY

Honey is a complex, natural, sweet and viscous liquid produced by bees through the nectar of flowers and plant exudates. Since Mexico has a great biodiversity of plants, the different types of honey could present relevant biological properties which are strongly tied to floral origin. The objective of this work was to elucidate the responsibility of the secondary metabolites in the antioxidant and antimicrobial properties of Mexican floral honeys. The biological material was selected based on the chemical composition and the antioxidant and antimicrobial properties of 14 honeys from central and southern Mexico. Bell blossom, cactus and orange honeys were chosen. The content of proline and hydrogen peroxide and the profile of phenolic compounds and sugar were analyzed through HPLC. The profile of secondary metabolites and antioxidant activity were investigated before and after a digestion process *in vitro*. Evaluation of antimicrobial activity was carried out with six pathogenic microorganisms; the honey, methanolic extracts, honey with catalase, hydrogen peroxide and an analogy of sugar were tested. Thirteen phenolic compounds were identified, the prominent ones being catequina, rutin, syringic and ferulic acid. The most prevalent sugars were fructose and glucose, followed by maltose, raffinose, saccharose and melibiose. The content of hydrogen peroxide was 88.33-111.83 ppm up to 609.68-964.97 ppm after 34 hours. The proline content was 333.88-575.93 mg/kg. Orange honey showed the best results for total phenol content and antioxidant activity *in vitro*. Compounds responsible for the antioxidant activity were phenolic compounds which acted by donating electrons and reducing free radicals. Bell blossom honey showed the best bio-accessibility index and antioxidant activity after the digestion process *in vitro*. All the samples evaluated inhibited the development of *Bacillus cereus*. Hydrogen peroxide played a very important part in the antimicrobial activity of honeys evaluated. The Mexican honeys evaluated possess antioxidant and antimicrobial activity chiefly due to the phenolic compounds and hydrogen peroxide.

(Key words: Floral honeys, chemical composition, antioxidant activity, antimicrobial activity)



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Miel	3
2.2. Composición química de la miel	3
2.3. Parámetros fisicoquímicos de calidad	10
2.4. Propiedades biológicas de la miel	12
2.4.1. Propiedad antioxidante	13
2.4.2. Propiedad antimicrobiana	14
2.5. Mecanismos de acción de los compuestos con actividad biológicas en miel	17
2.5.1. Mecanismo de acción de los compuestos con actividad antioxidante	17
2.5.1.1. Compuestos fenólicos como antioxidantes inhibidores de la reacción en cadena formadora de radicales libres	18
2.5.1.2. Compuestos fenólicos como antioxidantes queladores de metales	23
2.5.2. Mecanismo de acción de los compuestos con actividad antimicrobiana	25
2.5.2.1. Mecanismos de adaptación al estrés	27
2.5.2.2. Compuestos presentes en la miel que generan estrés	28
3. JUSTIFICACIÓN	31
4. OBJETIVO GENERAL	32
4.1. Objetivos particulares	32
5. MATERIALE Y MÉTODOS	33
5.1. Muestras	33

5.2.	Parámetros de calidad: color, humedad, prolina, acidez libre y total	34
5.3.	Determinación del perfil de azúcares mayoritarios por medio de HPLC	35
5.4.	Cuantificación de peróxido de hidrógeno	35
5.5.	Obtención de extractos fenólicos y análogo de azúcares	36
5.6.	Obtención del perfil de metabolitos secundarios mediante HPLC	36
5.7.	Contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante	37
5.7.1.1.	Fenoles totales	37
5.7.1.2.	Ensayo del radical ABTS	38
5.7.1.3.	Ensayo del radical DPPH	38
5.7.1.4.	Ensayo FRAP	39
5.7.1.5.	Evaluación de la actividad quelante	39
5.8.	Efecto del proceso de digestión <i>in vitro</i> en el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante	40
5.8.1.	Digestión <i>in vitro</i>	40
5.8.2.	Extracción sólido-líquido	40
5.8.3.	Evaluación de bioaccesibilidad	41
5.9.	Determinación de la actividad antimicrobiana de mieles mexicanas	43
5.10.	Análisis estadístico	45
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
6.1.	Selección de material biológico en función de parámetros químicos, actividad antioxidante y antimicrobiana de mieles mexicanas	46
6.1.1.	Parámetros químicos	46
6.1.2.	Contenido de fenoles totales y propiedades antioxidantes <i>in vitro</i>	49
6.1.3.	Propiedades antimicrobianas	53
6.1.4.	Estudio estadístico de asociaciones	57

6.2.	Caracterización química de tres mieles florales: Campanilla, Cactáceas y Naranja	60
6.2.1.	Perfil de metabolitos secundarios de mieles florales	60
6.2.2.	Perfil de azúcares mayoritarios en miel de Campanilla, Cactáceas y Naranja	62
6.2.3.	Cuantificación de peróxido de hidrógeno	64
6.2.4.	Contenido de prolina en las mieles en estudio	66
6.3.	Evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> de mieles florales (Campanilla, Cactáceas y Naranja) antes y después de un proceso de digestión <i>in vitro</i>	67
6.3.1.	Fenoles totales y actividad antioxidante en mieles florales, extractos metanólicos, un análogo de azúcares (AA) y prolina	67
6.3.2.	Determinación del efecto de la digestión <i>in vitro</i> en el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de mieles florales	77
6.3.2.1.	Bioaccesibilidad de los principales compuestos fenólicos en mieles florales y en un análogo de azúcares	77
6.3.2.2.	Bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos en mieles florales	82
6.3.2.3.	Efecto de la digestión <i>in vitro</i> sobre la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos de mieles florales	84
6.3.2.4.	Relación entre el perfil de compuestos fenólicos y el proceso de digestión <i>in vitro</i>	87
6.4.	Compuestos con actividad antimicrobiana de mieles florales: Campanilla, Cactáceas y Naranja.	89
6.4.1.	Miel	89
6.4.2.	Extractos metanólicos de mieles florales	92
6.4.3.	Catalasa con miel	94
6.4.4.	Peróxido de hidrógeno	95

6.4.5. Análogo de azúcares	96
7. CONCLUSIONES	97
8. PERSPECTIVAS	99
9. LITERATURA CITADA	100
ANEXO	113

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición química de la miel	4
2	Estructura de los principales oligosacáridos presentes en miel	5
3	Principales aminoácidos en la miel	6
4	Minerales presentes en miel	7
5	Estructuras de algunos compuestos fenólicos presentes en miel	8
6	Especificaciones fisicoquímicas de la miel (NMX-F-036-981, Codex alimentarius, 2001)	11
7	Constantes termodinámicas y cinéticas de las reacciones de los polifenoles, α -tocoferol y ascorbato como secuestrantes de radicales libres	21
8	Origen floral y nombre científico de mieles mexicanas empleadas en este estudio	33
9	Microorganismos y tratamientos empleados para la determinación de la actividad antimicrobiana en mieles florales	44
10	Parámetros químicos de las 14 mieles mexicanas analizadas	47
11	Fenoles totales y actividad antioxidante de 14 mieles mexicanas analizadas	50
12	Fenoles totales y actividad antioxidante de 14 extractos metanólicos de mieles mexicanas	51
13	Actividad antimicrobiana de 14 mieles mexicanas	55
14	Perfil de compuestos fenólicos de mieles florales (Campanilla, Cactáceas y Naranja)	61
15	Perfil de azúcares en mieles florales	63

16	Contenido de prolina en mieles florales	66
17	Contenido de fenoles totales en mieles florales, extractos metanólicos, un análogo de azúcares y prolina	68
18	Ensayo de ABTS para mieles florales, extractos metanólicos, un análogo de azúcares y prolina	71
19	Ensayo de DPPH para mieles florales, extractos metanólicos, un análogo de azúcares y prolina	74
20	Ensayo FRAP para mieles florales, extractos metanólicos, un análogo de azúcares y prolina	75
21	Actividad quelante para mieles florales, extractos metanólicos, un análogo de azúcares y prolina	76
22	Estructura de los compuestos fenólicos encontrados en las mieles evaluadas	78
23	Valores de pK para compuestos fenólicos presentes en las mieles en estudio	85
24	Valores de actividad antioxidante determinados antes y después del proceso de digestión <i>in vitro</i>	86
25	Perfil de compuestos fenólicos en mieles florales antes y después de un proceso de digestión <i>in vitro</i> ($\mu\text{g/g}$ 100 g miel)	88
26	Actividad antimicrobiana de mieles florales sobre microorganismos Gram positivos	90
27	Actividad antimicrobiana de mieles florales sobre microorganismos Gram negativos	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Interferencia de los compuestos fenólicos en la reacción en cadena	19
2	Características estructurales que definen la acción antioxidante de un flavonoide	21
3	Interacciones entre los estados fisiológicos de las células microbianas sometidas a diferentes grados de estrés	26
4	Diagrama del proceso de dializado en la digestión <i>in vitro</i>	42
5	Curva de crecimiento microbiano	53
6	Representación esquemática de los perfiles antioxidantes y antimicrobianos de 14 mieles mexicanas	59
7	Cuantificación de peróxido de hidrógeno en 48 horas en miel de Campanilla, Cactáceas y Naranja (promedio \pm barra de desviación estándar)	65
8	Gráfica de Log [] vs % Inhibición de miel completa utilizando el ensayo de ABTS.	70
9	Gráfica de Log [] vs %Inhibición de los extractos metanólicos de las mieles mediante el ensayo de ABTS	70
10	Gráfica de Log [] vs % Inhibición de miel completa utilizando el ensayo de DPPH	72
11	Gráfica de Log [] vs % Inhibición de extractos metanólicos utilizando el ensayo de DPPH	73
12	Digestión <i>in vitro</i> del AA: CF (Compuesto fenólico), cantidad de CF agregado al AA (CF agregado)	79
13	Estructuras propuestas de la oxidación de los dímeros de homo- y heterocatequina (Extraída de Neisol <i>et al.</i> , 2007)	81

14	Digestión <i>in vitro</i> de las mieles analizadas (% = porcentaje de bioaccesibilidad)	82
15	Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos en el AA después del proceso de digestión <i>in vitro</i>	84

1. INTRODUCCIÓN

La miel es un fluido dulce y viscoso. Se ha empleado como agente terapéutico durante miles de años en la medicina tradicional debido a sus propiedades antimicrobianas (Pichichero *et al.*, 2009). Sin embargo, hasta hace apenas un siglo, la miel no había sido estudiada de manera científica y no se tenía información acerca de los compuestos responsables de su actividad biológica.

La miel posee propiedades antioxidantes y antimicrobianas, que se deben principalmente a su composición química. Compuestos como azúcares, peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos le confieren las propiedades de inhibir el estrés oxidativo *in vitro* y el crecimiento de microorganismos patógenos (Ferreira *et al.*, 2009; Pichichero *et al.*, 2009). La composición química de la miel depende en gran medida del origen floral y de las condiciones geográficas y climáticas, por lo tanto las propiedades biológicas se ven fuertemente influenciadas por dichos factores (Al *et al.*, 2009).

México posee una amplia biodiversidad, lo que implica una amplia gama de material biológico, incluidas flores y plantas que poseen propiedades antioxidantes y antimicrobianas destacadas, los metabolitos responsables de estas propiedades podrían ser transportados por las abejas a las mieles Mexicanas por lo que esperaríamos que éstas presenten propiedades biológicas importantes.

Los compuestos fenólicos con actividad antioxidante son capaces de inhibir radicales libres por medio de la donación de electrones y átomos de hidrógeno, asimismo pueden secuestrar metales precursores de reacciones productoras de radicales libres. Por otra parte, los compuestos con actividad antimicrobiana son diversos y sus mecanismos de acción dependen en gran medida de sus características; pueden interferir en la síntesis en la pared celular, inhibir la síntesis de proteínas, interferir en la síntesis de ácidos nucleicos e inhibir la síntesis

metabólica.

Debido a que no existe suficiente información científica de los compuestos responsables de las propiedades biológicas de las mieles mexicanas, se plantea el estudio de tres muestras de mieles de origen floral (Campanilla, Cactáceas y Naranja) producidas en diferentes regiones de nuestro país. Para lo cual, se cuantifico el contenido de azúcares mayoritarios, contenido de prolina, peróxido de hidrógeno, compuestos fenólicos y se determinó su responsabilidad en la actividad antioxidante y antimicrobiana de las mieles en florales en estudio.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Miel

La miel es un fluido dulce y viscoso. Es producido por las abejas a partir del néctar de las flores, de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores de plantas. Las abejas lo recogen, transforman y combinan con sustancias propias y lo almacenan en los panales donde madura (Olaitan *et al.*, 2007).

Nuestro país se ubica como el tercer productor y exportador mundial de miel, sólo por debajo de China y Argentina. Las mieles producidas en México se han destacado por presentar altos estándares de calidad y son ampliamente cotizadas en el mundo (SAGARPA, 2011). El consumo de miel en México ha sufrido importantes incrementos en los últimos años, esto es debido a la tendencia generalizada por consumir productos de origen natural o que no contengan sustancias químicas en su elaboración (SAGARPA, 2011).

2.2. Composición química de la miel

La miel es un líquido complejo natural que contiene más de 180 sustancias (Arráez-Román *et al.*, 2006; Nagai *et al.*, 2006; Al *et al.*, 2009). Es un producto con una alta concentración de azúcares. Presenta como constituyentes minoritarios minerales, proteínas, vitaminas, ácidos orgánicos, flavonoides, ácidos fenólicos, y enzimas, entre otros (Cuadro 1) (Bertoncelj *et al.*, 2007; Al *et al.*, 2009). La composición química de la miel es dependiente en gran medida del origen floral, condiciones regionales, climáticas (Nagai *et al.*, 2006; Muñoz y Copaja, 2007; Vela *et al.*, 2007; Al *et al.*, 2009) y de procesamiento (Bertoncelj *et al.*, 2007).

Cuadro 1. Composición química de la miel.

<i>Compuestos</i>	<i>Porcentaje (%)</i>
Azúcares	70.00-75.00
Agua	10.00-20.00
Proteínas	0.01-0.20
Ácidos orgánicos	0.59
Minerales	0.04-0.20

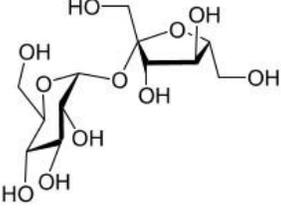
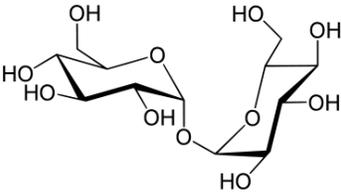
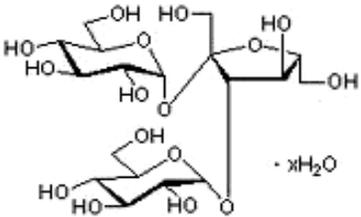
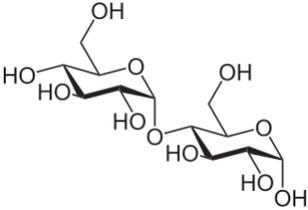
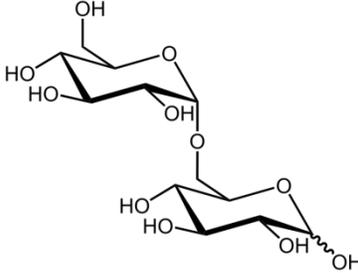
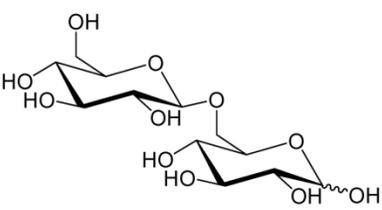
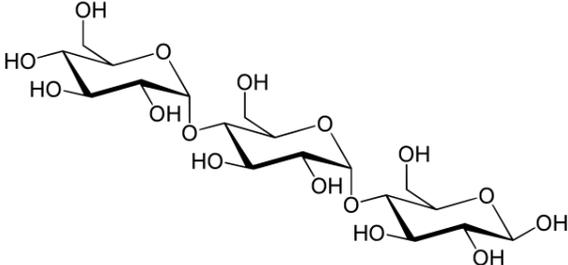
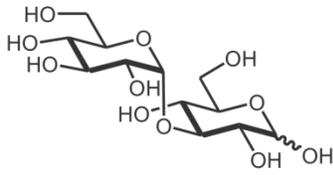
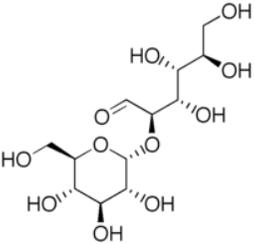
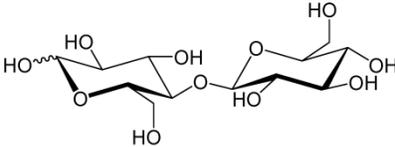
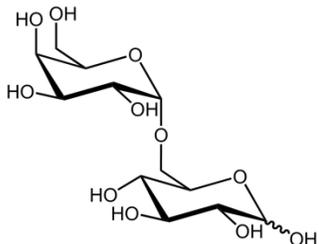
Tomado de Nagai *et al.*, 2006, Pérez *et al.*, 2007, Al *et al.*, 2009, Juszczak *et al.*, 2009.

Los azúcares son los componentes mayoritarios. Alrededor del 38% corresponde a la fructosa y 31% a la glucosa (Nagai *et al.*, 2006; Muñoz y Copaja, 2007; Al *et al.*, 2009). Se han reportado algunos oligosacáridos predominantes en cantidades menores, destacando: sacarosa, trehalosa, melezitosa, nigerosa, isomaltotriosa, melibiosa, kojibiosa, gentiobiosa, maltotriosa, maltosa y celobiosa. Las estructuras de los principales oligosacáridos presentes en la miel se muestran en el Cuadro 2 (Arias *et al.*, 2004; Al *et al.*, 2009).

El contenido de proteína es generalmente bajo. Los aminoácidos libres esenciales provienen probablemente de las glándulas salivales de las abejas (Freitas *et al.*, 2006). En el Cuadro 3 se muestran algunos de los aminoácidos encontrados en mieles de origen floral y de mielada (Pérez *et al.*, 2007). La prolina es el aminoácido mayoritario, desde el punto de vista cuantitativo representa casi el 50%. El contenido de este aminoácido puede ser empleado para distinguir mieles genuinas de miel que se produce con una fuente diferente a la floral (Baroni *et al.*, 2009).

El contenido de agua de acuerdo al Codex Alimentarius, 1993 (Codex Alimentario 1993/14), no debe de exceder al 20%; si esto ocurre se podría facilitar la fermentación, lo que acorta la vida de anaquel del producto.

Cuadro 2. Estructura de los principales oligosacáridos presentes en miel.

<p><i>Sacarosa</i></p> 	<p><i>Trehalosa</i></p> 	<p><i>Melezitosa</i></p> 
<p><i>Maltosa</i></p> 	<p><i>Isomaltosa</i></p> 	<p><i>Gentiobiosa</i></p> 
<p><i>Maltotriosa</i></p> 		<p><i>Nigerosa</i></p> 
<p><i>Kojibiosa</i></p> 	<p><i>Celobiosa</i></p> 	<p><i>Melibiosa</i></p> 

Cuadro 3. Principales aminoácidos en la miel.

<i>Compuesto</i>	<i>mg/kg miel</i>
Aminoácidos esenciales	
Histidina	7.5-18.0
Isoleucina	21.0-23.0
Leucina	20.0-23.0
Lisina	31.0-37.0
Fenilalanina	85.0-225.
Tirosina	59.0-116.0
Treonina	20.0-35.0
Triptófano	31.0-38.0
Valina	20.0-27.0
Aminoácidos no esenciales	
α -alanina	27.0-53.0
β -alanina	18.0-19.0
γ -ácido aminobutírico	25.0-89.0
Ácido aspártico	40.0-130.0
Ácido glutámico	70.0-270.0
Arginina	37.0-74.0
Asparagina	70.0-210.0
Glutamina	50.0-160.0
Glicina	13.0-21.0
Omitina	20.0-27.0
Prolina	570.0-740.0
Serina	20.0-55.0

Tomado de Pérez *et al.*, 2007.

El contenido de minerales es de alrededor del 0.04% en mieles claras y de 0.2% en mieles oscuras (Baroni *et al.*, 2009). Destacan, el potasio, sodio, calcio, magnesio, cobre, hierro, manganeso, fósforo, cloro, silicio, azufre, entre algunos otros (Arias *et al.*, 2003; Nagai *et al.*, 2006). En el Cuadro 4 se muestran algunos minerales presentes en la miel (Küçük *et al.*, 2007). Algunos de los metales que se encontraron en mínimas cantidades provienen probablemente de los materiales usados durante el procesamiento de la miel (centrifugación, contaminación procedente del contenedor en el almacenamiento, etc.) (Arias *et al.*, 2003)

Cuadro 4. Minerales presentes en miel.

<i>Mineral</i>	<i>Contenido (mg/kg miel)</i>
Sodio	73-163
Potasio	500-2095
Calcio	160-900
Hierro	1.72-2.64
Cobre	0.09-0.42
Zinc	0.54-0.68
Manganeso	0.59-9.69

Tomado de Küçük *et al.*, 2007.

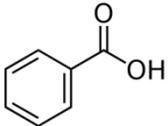
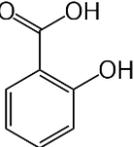
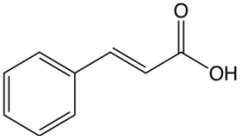
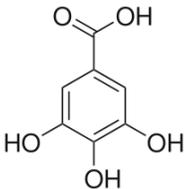
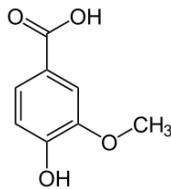
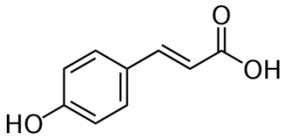
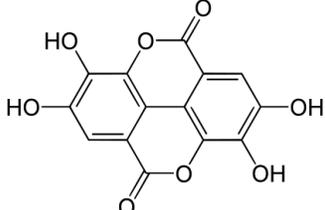
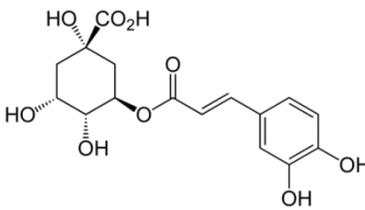
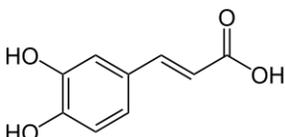
Las vitaminas, aunque en pequeñas dosis, a diferencia de las presentes en frutas y verduras, no se pierden de una forma rápida en su almacenamiento, sino que se conservan durante largo tiempo. Destacan la vitamina C, B (tiamina), el complejo B2 (riboflavina, ácido nicotínico) y la vitamina B6 (ácido pantoténico) (Olaitan *et al.*, 2007).

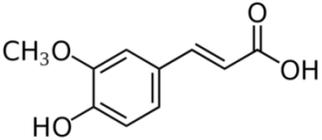
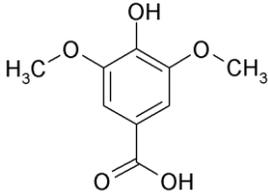
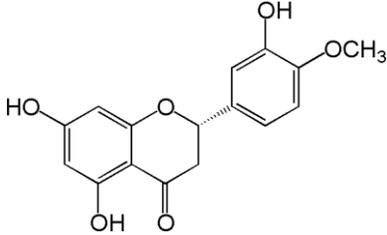
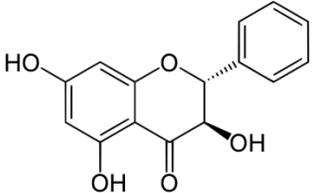
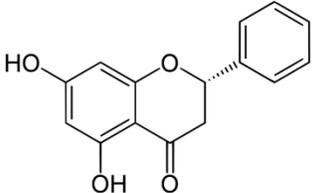
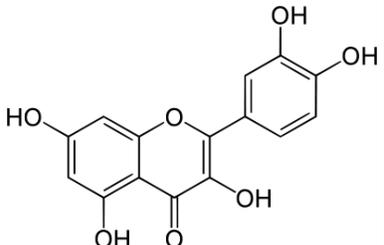
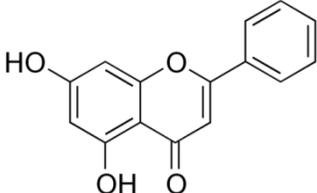
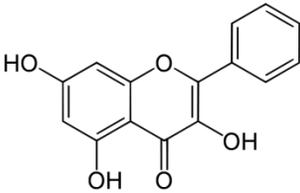
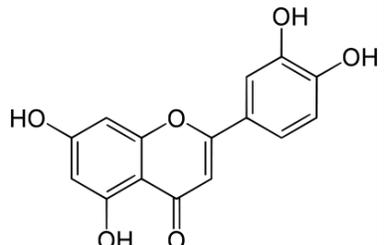
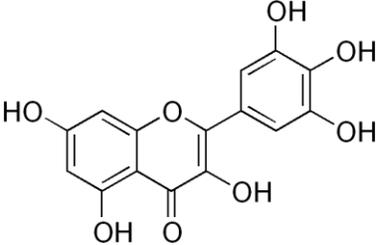
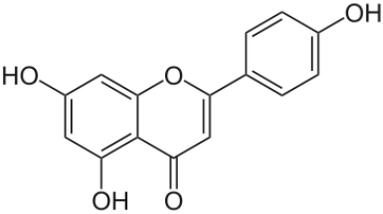
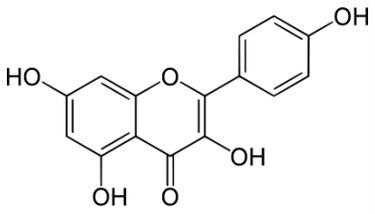
Los ácidos orgánicos representan el 0.57% e incluyen al ácido glucónico, el cual es un producto de la digestión enzimática de la glucosa. Estos son responsables de la acidez de la miel y contribuyen de manera importante a las características organolépticas (Olaitan *et al.*, 2007).

Las enzimas son de origen vegetal y animal, provienen del néctar o de las resinas empleadas para la elaboración de la miel y de las glándulas salivales de las abejas. Las enzimas de mayor importancia en la miel son: la glucosa oxidasa, catalasa, diastasa, invertasa y peroxidasa (Gheldof *et al.*, 2002; Bertonecelj *et al.*, 2007).

Los compuestos fenólicos identificados en su mayoría son ácidos fenólicos y flavonoides, entre los que destacan: el ácido gálico, vainillínico, cinámico, benzoico, hidroxibenzoico, *p*-coumárico, elágico, clorogénico, cafeico, ferúlico, siríngico mirecitina, hesperetina, pinobanksina, pinocembrina, quercetina, crisina, galangina, luteolina, genkwanina, apigenina y caempferol (Baltrusaityte *et al.*, 2007; Bertonecelj *et al.*, 2007; Muñoz y Copaja, 2007). En el Cuadro 5 se muestran las estructuras de algunos de ellos. Las propiedades biológicas de los compuestos fenólicos están estrechamente ligadas con sus estructuras, principalmente del número y arreglo de los grupos hidroxilo (Fernández-Pachón *et al.*, 2008).

Cuadro 5. Estructuras de algunos compuestos fenólicos presentes en miel.

<p>Ácido benzoico</p> 	<p>Ácido hidroxibenzoico</p> 	<p>Ácido cinámico</p> 
<p>Ácido gálico</p> 	<p>Ácido vainillínico</p> 	<p>Ácido <i>p</i>-coumárico</p> 
<p>Ácido elágico</p> 	<p>Ácido clorogénico</p> 	<p>Ácido cafeico</p> 

<p>Ácido ferúlico</p> 	<p>Ácido siríngico</p> 	<p>Hesperetina</p> 
<p>Pinobanksina</p> 	<p>Pinocembrina</p> 	<p>Quercetina</p> 
<p>Crisina</p> 	<p>Galangina</p> 	<p>Luteolina</p> 
<p>Mirecitina</p> 	<p>Apigenina</p> 	<p>Caempferol</p> 

Los compuestos mayoritarios se mantienen constantes en mieles procedentes de diferentes países, no así los compuestos minoritarios, estos varían dependiendo del origen floral y geográfico y de las condiciones de procesamiento.

2.3. Parámetros fisicoquímicos como criterio de calidad

Los parámetros de calidad en la miel son determinados en su mayoría por las características sensoriales, químicas, físicas y microbiológicas (Gomes *et al.*, 2010). Los criterios de calidad fisicoquímica están establecidos por el Consejo de la Unión Europea 2001/110 (EU, 2001). Entre éstos destacan, el contenido de humedad, hidroximetilfurfural, azúcares reductores, la actividad de la enzima diastasa, entre algunos otros.

Existen diversas organizaciones encargadas de regular y proponer los estándares en cuanto a calidad fisicoquímica se refiere, siendo de nuestro interés el Codex Europeo y la Norma Oficial Mexicana. Las especificaciones fisicoquímicas establecidas por estas dos entidades se presentan en el Cuadro 6. A continuación se describe brevemente la importancia de algunos de los principales indicadores de calidad.

El contenido de agua es un buen indicador para establecer la calidad de la miel, valores altos de humedad pueden producir su fermentación durante el almacenamiento, resultando con esto en la formación de alcohol etílico y dióxido de carbono. El alcohol puede oxidarse a su vez en ácido acético y agua, produciendo un sabor amargo desagradable (Isla *et al.*, 2011).

La miel posee un pH ácido que va de 3.5 hasta 4.5 debido al contenido de ácidos orgánicos. Aunque la apreciación sensorial de éstos es enmascarada por el predominante sabor dulce. La máxima acidez libre permitida es de 50 miliequivalentes de ácido láctico /kg, valores mayores indican una posible alteración microbiológica.

Cuadro 6. Especificaciones fisicoquímicas de la miel (NMX-F-036-981, Codex Alimentarius, 2001).

<i>Especificaciones</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
Contenido aparente de azúcar reductor expresado como % (g/100g) de azúcar invertido	63.88	-
Contenido de sacarosa (5 g/100g)	-	5.00
Contenido de glucosa % (g/100g)	-	38.00
Humedad % (g/100g)	-	20.00
Sólidos insolubles en agua % (g/100g)	-	0.30
Cenizas % (g/100g)	-	0.60
Acidez expresada como miliequivalentes de ácido láctico/kg	-	50.00
Hidroximetilfurfural (HMF), expresado en mg/kg en miel envasada. De más de 6 meses	-	80.00
Hidroximerilfurfural (HMF), expresado en mg/kg de miel envasada. De menos de 6 meses	-	40.00
Índice de diastasa		8.0*

* Para las mieles con bajo contenido enzimático, el índice mínimo de diastasa en la escala de Gothe será de 3.0 siempre y cuando no exceda en el contenido de HMF de 15 mg/kg.

El producto más importante al calentar la miel es el hidroximetilfurfural, se forma por la deshidratación de la hexosa especialmente a pH 5 o menores, o por las reacciones de Maillard; por lo que se le considera un indicador excelente de la frescura de la miel (Turhan *et al.*, 2008).

Los valores de acidez libre y láctica e HMF incrementan progresivamente, para el índice de diastasa se observa un comportamiento inverso, con el calentamiento y el almacenamiento prolongado (Castro-Vázquez *et al.*, 2008).

Los parámetros de calidad están estrechamente ligados con la vida de anaquel y las condiciones de almacenamiento y permiten observar el impacto de las condiciones climáticas y de manejo del producto.

2.4. Propiedades biológicas de la miel

La miel posee altos valores nutricionales (330 kcal/100g) y sus carbohidratos son de rápida absorción (El-Arab *et al.*, 2006). La composición química de la miel le confiere propiedades biológicas importantes, entre las que destacan la propiedad antioxidante y antimicrobiana.

La miel se ha empleado en etnomedicina desde hace miles de años y recientemente en el tratamiento de enfermedades de la garganta, desórdenes gastrointestinales, asma, heridas infectadas y crónicas, úlceras de la piel, cataratas, entre otros (Basson y Glober, 2008; Pichichero *et al.*, 2009). El efecto sobre estas enfermedades se atribuye a sus propiedades antimicrobianas y en algunos casos, cuando la enfermedad es provocada por daño oxidativo, a sus propiedades antioxidantes (Ferreira *et al.*, 2009).

La presencia de peróxido de hidrógeno y algunos minerales, particularmente hierro y cobre, puede provocar la generación de radicales hidroxilo reactivos como parte del sistema antibacteriano (Molan *et al.*, 1992); es evidente que este mecanismo debe ser controlado (la formación y remoción de especies reactivas de oxígeno). Adicionalmente, la miel es una fuente de antioxidantes, que proveen protección contra la reacción de oxidación deteriorativa en alimentos (causada por luz, calor y algunos metales).

2.4.1. Actividad antioxidante

En los últimos años, se ha descrito una serie creciente de compuestos que muestran el carácter emergente del potencial antioxidante de la miel de abeja; entre éstos se encuentran los compuestos fenólicos que también contribuyen a exaltar las características sensoriales no deseables tales como su amargor (Muñoz y Copaja, 2007). Los productos de la reacción de Maillard se han relacionado con la inhibición de la formación de radicales libres al secuestrar el hierro y cobre en productos cárnicos (Antony *et al.*, 2002). Además, se ha observado una relación de la actividad antimicrobiana con el aminoácido mayoritario, la prolina (Bogdanov, 1997).

Compuestos fenólicos

Diversos autores han señalado que la miel tiene un notable perfil fenólico que es aportado por varios ácidos y ésteres orgánicos aromáticos y por las agliconas de flavonoides (Muñoz y Copaja, 2007). La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos previene el deterioro oxidativo en alimentos, como la oxidación lipídica en carne y el oscurecimiento enzimático en frutas y verduras (Arráez-Román *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2006; Baltrusaityte *et al.*, 2007; Vela *et al.*, 2007); además de retardar reacciones biológicamente destructivas derivadas del estrés oxidativo y relacionadas con enfermedades cardíacas, cáncer, enfermedades del sistema inmune, cataratas y diferentes procesos inflamatorios (Baltrusaityte *et al.*, 2007; Bertonecely *et al.*, 2007).

Productos de la reacción de Maillard

Los productos de la reacción de Maillard se generan de la interacción de los azúcares provenientes de la miel y proteínas que provienen de alimentos ricos en estas, como la carne. Estos previenen las reacciones de oxidación en sistemas lipídicos (Antony *et al.*, 2000; Antony *et al.*, 2002; Nagai *et al.*, 2006), actúan como catalizadores secundarios de oxidación, sirviendo como donadores de electrones

para hidroperóxidos, inactivan los radicales libres, secuestran oxígeno y quelan metales (Antony *et al.*, 2002). Algunos productos de la reacción de Maillard como la glucosa-lisina, ribosa-lisina y la fructosa-lisina presentan actividad antioxidante. La xilosa-lisina actúa como un agente secuestrante de oxígeno y muestra actividad antioxidante en sistemas modelo (Antony *et al.*, 2000).

Prolina

La prolina es el principal aminoácido de la miel, proviene del néctar de las flores o exudados de plantas (Mohammed y Babiker, 2010). Este aminoácido se ha relacionado con la prevención de la peroxidación lipídica y regulación de enzimas antioxidantes en plantas sometidas a condiciones de estrés ambiental, específicamente estrés por frío y por peróxido de hidrógeno (Kumar y Kumar-Yadav, 2009; Ozden *et al.*, 2009). La miel genera peróxido de hidrógeno por medio de la enzima glucosa oxidasa, por lo que la prolina podría estar actuando como estabilizador de la formación de radicales libres generados por éste. Además, podría estar relacionada con la actividad antioxidante de la miel después de ser consumida.

2.4.2. Actividad antimicrobiana

El empleo de la miel como antimicrobiano se remonta a más de 2000 años, se utilizaba en el tratamiento de heridas infectadas, mucho antes de que las bacterias fueran descubiertas como causa de las infecciones. Posee efecto inhibitorio contra más de 60 especies de bacterias incluyendo aerobios y anaerobios, Gram-positivas y Gram-negativas (Olaitan *et al.*, 2007). Algunas investigaciones realizadas *in vitro*, señalan la efectividad de la miel frente a bacterias patógenas, entre las que destacan *E. coli*, *S. aureus* y *S. Typhimurium* (Estrada *et al.*, 2005; Fangio *et al.*, 2007; Olaitain *et al.*, 2007).

Los factores que intervienen en la actividad antimicrobiana de la miel son: la acidez, la osmolaridad, la generación enzimática de peróxido de hidrógeno vía

glucosa oxidasa y algunos compuestos fitoquímicos minoritarios (Brudzynski, 2006; Fangio *et al.*, 2007; Olaitan *et al.*, 2007).

Efecto osmótico

La miel es una solución de azúcar supersaturada, el 84% es una mezcla de fructosa y glucosa. La fuerte interacción de las moléculas de azúcar deja muy pocas moléculas de agua disponibles para los microorganismos. La actividad de agua de la miel va desde 0.52 hasta 0.62 (Estrada *et al.*, 2005; Olaitan *et al.*, 2007), valores que impiden el crecimiento de casi cualquier microorganismo con excepción de algunas levaduras y bacterias osmofílicas (Estrada *et al.*, 2005). La alta concentración de azúcar provoca la salida de líquidos de los tejidos, creando un ambiente húmedo aséptico que inhibe el crecimiento del microorganismo patógeno (Cabrera *et al.*, 2006).

Acidez y pH

La acidez de la miel se debe a la presencia de ácidos orgánicos y es determinada por el contenido de ácido glucónico, el cual es resultado de la reacción enzimática de la glucosa oxidasa (Bogdanov, 1997; Estrada *et al.*, 2005; Vorlova *et al.*, 2005; Olaitan *et al.*, 2007). El contenido de ácidos orgánicos produce valores bajos de pH que se encuentran en un intervalo de 3.2 a 4.5. El pH mínimo para el crecimiento de algunos patógenos es: *E. coli* (4.3), *Salmonella* spp. (4.0), *P. aeruginosa* (4.4), *S. pyogenes* (4.5). En la miel sin diluir la acidez es un importante factor en la actividad antibacteriana (Olaitan *et al.*, 2007).

Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno en la miel es producido por la oxidación de la glucosa, catalizada por la enzima glucosa oxidasa proveniente de las glándulas de las abejas durante el periodo de maduración de la miel (Brudzynski, 2006; Olaitan *et*

al., 2007, Weston *et al.*, 1999). La concentración de peróxido es aproximadamente 1000 veces menor que en las soluciones usadas como antisépticos (Estrada *et al.*, 2005).



La eficiencia de la reacción incrementa con la dilución de la miel por un factor de 2,500 a 50,000, esto produce un antiséptico de “liberación lenta” (Olaitan *et al.*, 2007). La continua producción de peróxido de hidrógeno en la miel cuando ésta es aplicada en heridas genera un efecto antiséptico sostenido (Estrada *et al.*, 2005). La glucosa oxidasa produce peróxido de hidrógeno eficientemente sólo después de que se diluye la miel (Mundo *et al.*, 2004).

Por otro lado, la catalasa es una enzima proveniente de las abejas que inactiva a la glucosa oxidasa por lo que la producción de peróxido de hidrógeno se ve mermada. Los niveles de peróxido de hidrógeno son determinados por los niveles de glucosa oxidasa y catalasa (Taomari *et al.*, 2001). Las condiciones de almacenamiento pueden inhibir la enzima lo que disminuye el porcentaje de peróxido de hidrógeno y por ende su responsabilidad en la actividad antimicrobiana.

Compuestos no-peróxido

La actividad antimicrobiana de la miel producida por compuestos diferentes al peróxido de hidrógeno se cree está relacionada con la fuente floral (Weston *et al.*, 1999). Los compuestos que se han reportado con actividad antimicrobiana y que no tienen ninguna relación con el peróxido de hidrógeno pueden clasificarse en tres grupos: (i) compuestos derivados de plantas, tales como flavonoides (pinocembrina, crisina, galangina, pinobanksina), ácidos fenólicos (siringico, ferulíco, cinámico, benzoico y caféico) (Weston *et al.*, 1999) y ácidos no-aromáticos; (ii) catalasa derivada del polen; y (iii) compuestos proteináceos (Brudzynski, 2006).

Los flavonoides provienen generalmente del propóleo, un material residual que las abejas colectan de gomas exudadas de árboles, otros compuestos fenólicos provienen del néctar de las flores que las abejas emplean para elaborar la miel (Taomari *et al.*, 2001). Estos productos químicos complejos no se descomponen bajo el calor o la luz, ni son afectados por la dilución de la miel. La evidencia más directa de la existencia de los factores antibacteriales de tipo no-peróxido en la miel se observa en los informes de actividad persistente en mieles tratadas con catalasa para eliminar la actividad de peróxido de hidrógeno (Olaitan *et al.*, 2007).

Algunos autores señalan que el peróxido de hidrógeno es el principal agente antibacteriano en la miel, otros sin embargo, le atribuyen la responsabilidad de la actividad antimicrobiana a los compuestos de tipo no-peróxido (Bogdanov, 1997), debido a que la glucosa oxidasa es inactivada en mieles maduras y el contenido de peróxido de hidrógeno es insuficiente para inhibir el crecimiento bacteriano (Cabrera *et al.*, 2006).

Existe poca información acerca del efecto de las mieles en microorganismos patógenos en alimentos. En este sentido, Taomari *et al.* (2001) reportaron la inhibición del crecimiento de *S. sonni*, *L. monocytogenes* y *S. aureus* por mieles florales diluidas a 25 % (p/v). Al tratar las mieles analizadas con catalasa la inhibición se redujo, indicando que el peróxido contenido en la miel contribuye con la actividad antimicrobiana.

2.5. Mecanismos de acción de los compuestos con actividad biológica en miel

2.5.1. Mecanismo de acción de los compuestos con actividad antioxidante

Existe evidencia de que los radicales libres son causantes de la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y que esta oxidación provoca a su vez

complicaciones biológicas incluyendo cáncer, mutaciones, envejecimiento y aterosclerosis (Pérez *et al.*, 2006). Los antioxidantes naturales pueden detener o reducir esta oxidación.

Entre las moléculas biológicas que funcionan como antioxidantes encontramos a los compuestos fenólicos, destacando los flavonoides, compuestos nitrogenados y carotenoides entre algunos otros (Sarıkaya *et al.*, 2009).

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la acción biológica de los polifenoles en animales. Fraga *et al.* (2010) proponen dos clasificaciones: mecanismos generales o no específicos y mecanismos específicos, dependiendo de las particularidades químicas y las características estructurales de los polifenoles con actividad biológica. Entre los mecanismos no específicos destacan la actividad antioxidante (secuestrar radicales libres y quelar metales) y las interacciones de los polifenoles con membranas. En el caso de los mecanismos específicos tenemos las interacciones de los polifenoles con enzimas, factores de transcripción, entre otros. A continuación se describen los parámetros termodinámicos y cinéticos de la inhibición de la reacción de la oxidación lipídica y la quelación de metales de los compuestos antioxidantes.

2.5.1.1. Compuestos fenólicos como antioxidantes inhibidores de la reacción en cadena formadora de radicales libres.

Parámetros termodinámicos de la inhibición de la reacción en cadena de radicales libres. El evento más importante en la oxidación de los sistemas biológicos es la oxidación lipídica, ocurre como una reacción en cadena que envuelve lípidos (LH), moléculas de oxígeno como substrato y metales como catalizadores (Figura 1A) (Galleano *et al.*, 2010). Los compuestos fenólicos interfieren en la cadena de reacción de la oxidación lipídica (Figura 1B).

A	B
<p>Iniciación: $LH \rightarrow L^\bullet$</p> <p>Propagación: $L^\bullet + O_2 \rightarrow LOO^\bullet$ $LOO^\bullet + LH \rightarrow LOOH + L^\bullet$</p> <p>Terminación: $L^\bullet + L^\bullet \rightarrow \text{producto no radical}$ $LOO^\bullet + LOO^\bullet \rightarrow \text{producto no radical}$ $L^\bullet + LOO^\bullet \rightarrow \text{producto no radical}$</p>	<p>Iniciación: $LH \rightarrow L^\bullet$ reacción 1</p> <p>Propagación:</p> <p> $L^\bullet \xrightarrow{O_2} LOO^\bullet$ reacción 2 $L^\bullet \xrightarrow{FOH} LH + FO^\bullet$ reacción 2'</p> <p> $LOO^\bullet \xrightarrow{LH} LOOH + L^\bullet$ reacción 3 $LOO^\bullet \xrightarrow{FOH} LOOH + FO^\bullet$ reacción 3'</p> <p>Terminación: $L^\bullet + LOO^\bullet \rightarrow \text{producto no radical}$ $L^\bullet + L^\bullet \rightarrow \text{producto no radical}$ $LOO^\bullet + LOO^\bullet \rightarrow \text{producto no radical}$ $L^\bullet + FO^\bullet \rightarrow \text{producto no radical}$ $LOO^\bullet + FO^\bullet \rightarrow \text{producto no radical}$ $2 FO^\bullet \rightarrow \text{producto no radical}$</p>

Figura 1. Interferencia de los compuestos fenólicos en la reacción en cadena. Secuencia de reacción involucrada en el proceso de oxidación lipídica en ausencia (A) o presencia de los compuestos fenólicos (FOH) actuando como antioxidantes (B). LH, molécula lipídica; L^\bullet , radical lipídica; LOO^\bullet , radical lipídico peroxilo; LOOH lípido hidroperoxilo; FOH, compuesto fenólico; A^\bullet , radical libre derivado del antioxidante; FO^\bullet , radical libre derivado del compuesto fenólico.

La inhibición de la reacción en cadena de la lipo-oxidación, puede ser considerado uno de los mecanismos más importantes que explica la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. Generalmente, los secuestrantes de radicales libres (AH) inhiben o retardan la oxidación lipídica al interferir con la propagación de la reacción en cadena.

La mayoría de los polifenoles comparten dos características químicas, que son las responsables de la eficiencia de la reacción antioxidante ($LOO^\bullet + FOH \rightarrow LOOH + FO^\bullet$): i) los grupos OH de los fenoles que son capaces de reducir los radicales libres a través de la donación de un electrón; y ii) la estructura aromática que permite

la estabilización por resonancia de los radicales aroxilo resultantes (FO^\bullet) (Bors *et al.*, 1990).

La espontaneidad de la reacción de óxido-reducción que produce radicales libres es calculada como $\Delta G'$ de la reacción, $\Delta G' = -nF \Delta E'$. Para las reacciones de radicales libres $n = 1$ (el número de electrones transferidos de un compuesto reducido a oxidado), F representa la constante de Faraday (96.485 coulomb/mol de electrones) y $\Delta E'$ es la diferencia entre el potencial de reducción biológico estándar (E°'). Esta diferencia es calculada como E°' de las especies que se reducen menos el E°' de las especies que se oxidan.

El potencial de reducción estándar (E°) representa la tendencia de la forma oxidada de la molécula o el átomo (los radicales libres en este caso) para ser reducida por un electrón receptor. E° calculado para condiciones biológicas (E°') en la reacción inhibitoria de radicales libres, puede ser usado para predecir la factibilidad de que una reacción antioxidante pueda darse (Cuadro 7).

La estabilidad de la forma FO^\bullet determinará el potencial del polifenol en la inhibición de la reacción en cadena. Un FO^\bullet relativamente no reactivo inhibirá o reducirá la velocidad de la oxidación lipídica, mientras que un FO^\bullet altamente reactivo podría propagar en lugar de inhibir la reacción en cadena. Basado en lo anterior, se han establecido algunos requerimientos estructurales en la molécula del flavonoide para obtener un FO^\bullet estable que pueda ser asimilado para las necesidades de un antioxidante capaz de romper la cadena oxidativa (Figura 2).

Cuadro 7. Constantes termodinámicas y cinéticas de las reacciones de los polifenoles, α -tocoferol y ascorbato como secuestrantes de radicales libres (Tomado de Fraga *et al.*, 2010).

Reacción antioxidante ^a	$-E^{\circ'}_{(AH/A^{\bullet})}$ ^b (mV)	Índice de velocidad	k ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	[AH] ^c (μM)	Velocidad relativa ^d (s^{-1})
$\text{LOO}^{\bullet} \text{ASC} \rightarrow \text{LOOH} + \text{ASC}^{\bullet}$	282	$V_{\text{ASC}} = k_{\text{ASC}} [\text{LOO}^{\bullet}][\text{ASC}]$	1.0	50	50
$\text{LOO}^{\bullet} \text{TP} \rightarrow \text{LOOH} + \text{TP}^{\bullet}$	500	$V_{\text{TP}} = k_{\text{TP}} [\text{LOO}^{\bullet}][\text{TP}]$	1.0	28	28
$\text{LOO}^{\bullet} \text{EC} \rightarrow \text{LOOH} + \text{EC}^{\bullet}$	570	$V_{\text{EC}} = k_{\text{EC}} [\text{LOO}^{\bullet}][\text{EC}]$	7.3	0.3	2.0
$\text{LOO}^{\bullet} \text{QC} \rightarrow \text{LOOH} + \text{QC}^{\bullet}$	330	$V_{\text{QC}} = k_{\text{QC}} [\text{LOO}^{\bullet}][\text{QC}]$	15.0	0.1	1.5
$\text{LOO}^{\bullet} \text{RV} \rightarrow \text{LOOH} + \text{RV}^{\bullet}$	650	$V_{\text{RV}} = k_{\text{RV}} [\text{LOO}^{\bullet}][\text{RV}]$	0.03	0.4	0.01

^a Reacción del antioxidante (AH) con el radical peroxilo (LOO^{\bullet}). ASC = ácido ascórbico; TP = α -tocoferol; EC = (-) epicatequina; QC = quercetina; y RV = resveratrol.

^b Los potenciales de reducción son definidos para $\text{A}^{\bullet} \rightarrow \text{AH}$; el signo negativo hace $E^{\circ'}$ consistente con la reacción antioxidante propuesta ($\text{AH} \rightarrow \text{A}^{\bullet}$).

^c Concentración de plasma estimada para los compuestos antioxidantes.

^d Velocidad relativa es definida como la velocidad dividida por $[\text{LOO}^{\bullet}]$.

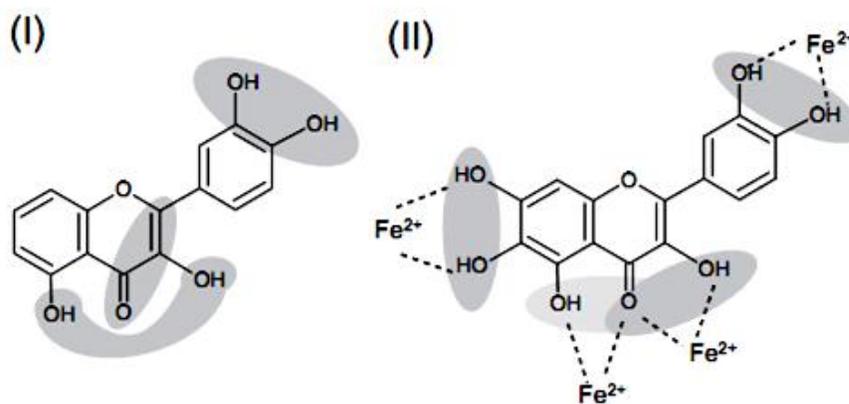


Figura 2. Características estructurales que definen la acción antioxidante de un flavonoide.

En la Figura 2 se describen los requerimientos estructurales asociados a la actividad antioxidante de un flavonoide como inhibidor de la cadena oxidativa (I) y quelador de metales (II). En (I), las áreas resaltadas definen los tres puntos críticos para una máxima actividad antioxidante de los flavonoides: i) grupo catecol (grupos 3'-4' hidroxilo) en el anillo B, ii) doble ligadura 2-3 en la conjugación con un 4-ceto funcional en el anillo C y iii) la presencia de los grupos 2- y 5-hidroxilo en los anillos C y A. En (II), las áreas resaltadas y líneas punteadas definen los sitios de quelación del hierro (Fraga *et al.*, 2010).

Cinética de la inhibición de la reacción en cadena formadora de radicales libres. Los análisis termodinámicos sólo predicen si una reacción particular se lleva a cabo o no espontáneamente. La concentración actual de reactantes (oxidantes y antioxidantes) y catalizador son los determinantes finales para que se produzca la formación del producto en una adecuada escala de tiempo (Galleano *et al.*, 2010).

En los sistemas biológicos la generación de radicales libres es constante, las reacciones químicas de los antioxidantes pueden ser consideradas como una competencia entre reacciones paralelas (Figura 1B, reacción 2 y 2'; 3 y 3'). Por ejemplo, LOO^\bullet es capaz de reaccionar con compuestos celulares (lípidos) o con antioxidantes. Esto es posible, y es más realista el caso de reacciones paralelas múltiples, una para cada uno de los compuestos celulares y una para cada uno de los antioxidantes presentes. Reduciendo estas reacciones al mínimo, un lípido y algunos antioxidantes, y suponiendo reacciones paralelas como reacciones de segundo orden, es posible tener una idea del potencial antioxidante de los compuestos fenólicos. La velocidad de cada una de las reacciones será dependiente de la constante de velocidad y la concentración de los reactantes (Galleano *et al.*, 2010).

Las bajas concentraciones de los compuestos fenólicos en el plasma sanguíneo, aún incluso después del consumo de alimentos ricos en éstos, deja una situación cinéticamente desfavorable con respecto a otros compuestos con similares

capacidades termodinámicas de inhibir a las radicales libres (28 y 50 μM para el α -tocoferol y el ácido ascórbico, respectivamente) (Fraga *et al.*, 2010).

Además, la biodisponibilidad de los polifenoles es generalmente baja, las concentraciones más altas que se pueden monitorear en los seres humanos después de su consumo están en un intervalo nanomolar con un pico máximo después de 2-6 horas de la ingestión, y son eliminadas rápidamente en el plasma (Fraga, 2007).

Por lo tanto, es poco probable que el potencial de acción de los polifenoles como secuestrantes de radicales libres sea fisiológicamente relevante en la mayoría de los órganos, con excepción de los expuestos a altas concentraciones como el tracto gastrointestinal y quizás la sangre (Galleano *et al.*, 2010).

2.5.1.2. Compuestos fenólicos como antioxidantes queladores de metales

Termodinámica del secuestro de metales por compuestos fenólicos. La velocidad espontánea de descomposición de peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos lipídicos para generar radicales ($\bullet\text{OH}$), es muy lenta. Sin embargo, en la presencia de ciertos metales que pueden actuar como catalizadores, estas velocidades de reacción se incrementan y pueden llegar a ser relevantes en sistemas biológicos (Galleano *et al.*, 2010).

Metales como el hierro y cobre son ejemplos de metales que tienen más de un estado redox y pueden funcionar como catalizadores en la formación de radicales. Consecuentemente, el secuestro del hierro y/o cobre para prevenir la formación de radicales libres catalizados por metales es otra estrategia antioxidante (Moret *et al.*, 1998).

Las fracciones catecol y las combinaciones de los grupos hidroxilo y carbonilo presentes en los compuestos fenólicos son núcleos de alta afinidad para los iones metálicos; sin embargo, se han observado grandes diferencias entre la capacidad de quelar metales entre diferentes compuestos fenólicos (Arora *et al.*, 1996). El enlace metal-compuesto fenólico ocurre preferentemente en el grupo 3-hidroxilo-4-carbonilo, seguido del grupo 4-carbonilo-5-hidroxilo y el grupo 3'-4'-hidroxilo (Figura 2, II) (Ren *et al.*, 2008).

Es importante considerar que la quelación de metales de transición no siempre resultará en una actividad antioxidante. Como las propiedades redox de los metales cambian debido a la quelación, el E° de cada uno de los compuestos metal-compuesto fenólico será determinante de la conducta posterior (Fraga *et al.*, 2010).

En el medio intracelular, el Fe^{2+} se asocia con una variedad de compuestos, por ejemplo, fosfatos, citratos, etc., con habilidades diferentes para promover la formación de radicales (Rush *et al.*, 1990). Para funcionar como un antioxidante, los complejos polifenol-metal deben ser menos eficientes en la promoción de la formación de radicales que los complejos fisiológicos. Por último, es importante señalar que los complejos de compuestos fenólicos-metales también han mostrado otras acciones antioxidantes, como la imitación de los efectos de la superóxido dismutasa por el complejo quercetina- Fe^{2+} (de Souza y De Giovani, 2004).

Cinética del secuestro de metales por compuestos fenólicos. Cuando se evalúa la relevancia *in vivo* de la quelación de metales para explicar la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos otro hecho fisiológico que se debe de tomar en consideración es la pequeña cantidad de los metales capaces de catalizar la formación de radicales libres.

Un análisis cinético básico es una reacción Fenton *in vivo* mediada por Fe^{2+} . El hierro involucrado en este proceso, usualmente llamado “hierro activo redox”, en

los sistemas fisiológicos, citosol y plasma, se encuentra en bajas concentraciones ($\leq 5 \mu\text{M}$ y $\leq 1 \mu\text{M}$, respectivamente). Los compuestos fenólicos deben ser capaces de disminuir la velocidad de descomposición del peróxido de hidrógeno por quelación de una fracción del “hierro activo redox” generando un complejo compuesto fenólico-hierro con una constante k muy baja para la reacción de Fenton.

Se puede inferir que la concentración de los compuestos fenólicos en los tejidos humanos y animales no es suficiente para desplazar a los compuestos fisiológicos que quelan metales. Esto puede limitar el papel de los compuestos fenólicos en el secuestro de metales de transición bajo condiciones en donde el “hierro activo redox” y/o otros metales activos redox, se encuentre en exceso, y/o donde exista una alta concentración de compuestos fenólicos, por ejemplo en el tracto gastrointestinal (Gallegos *et al.*, 2010).

2.5.2. Mecanismo de acción de los compuestos con actividad antimicrobiana

Como se comentó previamente la miel posee compuestos que presentan actividad antimicrobiana, sin embargo, los microorganismos pueden generar mecanismos para protegerse de la actividad de estos compuestos generadores de estrés, sobrevivir y propagarse nuevamente, provocando resistencia. El aumento de la resistencia del microorganismo a los factores nocivos tras la exposición a estrés moderado se describe comúnmente como la adaptación al estrés (Figura 3).

El estrés se define como cualquier condición que afecte adversamente el crecimiento o supervivencia de los microorganismos. Un estrés ligero describe un nivel subletal de estrés que no afecta la viabilidad, pero reduce o inhibe la velocidad de crecimiento. Un estrés moderado se refiere al que no sólo afecta el crecimiento del microorganismo sino que también causa una pérdida de viabilidad. Un estrés

extremo o severo describe un nivel de estrés que es normalmente letal para la célula, resultando en la muerte de la mayoría de la población.



Figura 3. Interacciones entre los estados fisiológicos de las células microbianas sometidas a diferentes grados de estrés (Tomado de Yousef y Juneja, 2003).

Otro término importante al respecto de la supervivencia microbiana al estrés es la adaptación. Se refiere a la respuesta al estrés, en este caso, el incremento a la tolerancia al mismo o diferente tipo de estrés. La adaptación induce tolerancia, habituación, climatización o resistencia al estrés (Neidhardt y VanBogelen, 2000).

Las respuestas al estrés pueden ser de varios tipos (Davidson y Harrison, 2002):

1. Producción de proteínas que reparan el daño, mantienen la célula o eliminan el agente del estrés.
2. Aumento transitorio en la resistencia o tolerancia para el factor perjudicial.
3. La célula se transforma a un estado inactivo, por ejemplo formación de esporas o paso a un estado viable-pero-no-cultivable.
4. Evasión de las defensas del organismo anfitrión.

2.5.2.1. Mecanismos de adaptación al estrés

Los factores de estrés inducen respuestas celulares que varían dependiendo del tipo, magnitud y método de aplicación del estrés. Las bacterias estresadas-adaptadas pueden ser capaces de resistir uno o varios tipos de estrés y en algunos casos sobrevivir condiciones normalmente perjudiciales o letales. Existe evidencia que señala que las bacterias patógenas que se adaptaron al estrés pueden incrementar su habilidad de causar enfermedades (Yousef y Juneja, 2003).

La resistencia que presentan algunos microorganismos a los antimicrobianos se puede clasificar en resistencia innata o adquirida. La resistencia innata es controlada cromosomalmente y está asociada con el género, especie o cepa del microorganismo. Los mecanismos de resistencia pueden incluir: de barrera como la membrana exterior de las bacterias Gram-negativas, los ácidos teicoicos de las bacterias Gram-positivas; bombeo de los compuestos antimicrobianos hacia el exterior de la célula y la inactivación vía enzimas. La resistencia adquirida resulta de los cambios genéticos en la célula microbiana a través de mutaciones o material genético adquirido. La resistencia a los antibióticos puede incluir inactivación enzimática o modificación, ausencia de enzima o de un paso metabólico, bombeo hacia el exterior de la célula de compuestos antimicrobianos, modificación del sitio de ataque, derivación de un paso sensible o sobreexpresión de sitios de ataque (Davidson y Harrison, 2002).

2.5.2.2. Compuestos presentes en la miel que generan estrés

Acidez

La acidez en la miel se debe principalmente al contenido de ácidos orgánicos. La miel presenta un pH que va desde 3.3 a 4.5 (Mundo *et al.*, 2004). Las bacterias sometidas a la acidez de la miel responden de manera diferente. Las respuestas incluyen cambios en la composición de la membrana, incremento en el flujo de protones, incremento en el catabolismo de los aminoácidos y la inducción de las enzimas de reparación del ADN. En algunas bacterias se ha observado que la respuesta a la tolerancia de la acidez (TA) es un fenómeno producido por la exposición a un bajo pH induciendo la síntesis de proteínas que promoverán la supervivencia a pH bajos extremos. La TA es diferente en la fase exponencial y estacionaria de las células. La respuesta difiere dramáticamente dependiendo de la especie bacteriana (Davidson y Harrison, 2002).

La señal para la inducción del choque ácido o la adaptación de las proteínas puede ser el pH intracelular o extracelular. El pH externo puede ser detectado por las proteínas que se encuentran en los límites de la membrana. El pH interno puede afectar la expresión directa de genes o puede alterar los componentes involucrados en la expresión de genes (Yousef y Juneja, 2003).

Al someter a *Salmonella* a estrés por acidez en la fase exponencial ésta reacciona induciendo la expresión de proteínas, además de presentar un decremento de la expresión de flagelos y la movilidad celular. Se sugiere que la represión flagelar a pH bajos ayuda a limitar el flujo de protones en el citosol. En *E. coli* a pH 5 se expresa el gen de la enzima sintetasa de ácidos grasos para reforzar la membrana bacteriana, lo que genera un incremento de la supervivencia al someter posteriormente al microorganismo a pH 3. Los cambios en la membrana pueden afectar la permeabilidad de los protones a través de ella.

Las bacterias Gram positivas regulan el pH con una ATPasa, pueden disminuir la síntesis o la actividad de esta enzima para reducir el pH, proveyendo a la célula de una gran capacidad para incrementar el flujo de salida de protones (Brul y Coote, 1999). El bajo pH en el citoplasma puede causar daño al DNA. Se han identificado enzimas reparadoras de DNA inducidas por la acidez en células de *Streptococcus mutans*. El catabolismo de aminoácidos puede ayudar a la célula a modificar el flujo de salida de protones. Además de alcalinizar el citoplasma.

Estrés osmótico

A altas concentraciones de azúcares es esencial para la célula microbiana conservar la presión turgente y la hidratación. El mejor mecanismo por el cual la bacteria responde a una condición hiperosmótica involucra la acumulación de solutos compatibles. Esto puede darse por la síntesis de estos solutos o la importación del medio. Los solutos compatibles son compuestos polares altamente solubles que contrarrestan la presión osmótica sin afectar la funcionalidad normal de la célula, incluso a altas concentraciones. La acumulación de estos compuestos es regulada por niveles de transcripción de genes o por la actividad directamente de enzimas modificadas (Yousef y Juneja, 2003).

Adicionalmente, los cambios en el metabolismo celular en respuesta al estrés osmótico involucran a la membrana celular. Se observa un incremento en el contenido de ácidos grasos insaturados *cis* en relación a los *trans* y un incremento en la proporción de fosfolípidos aniónicos y/o glicolípidos.

Estrés oxidativo

Las bacterias pueden estar expuestas a especies reactivas de oxígeno tales como peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y superóxidos. Estos oxidantes causan daño a las proteínas celulares, lípidos y ácidos nucleicos. Muchas de las

proteínas inducidas por el estrés oxidativo tienen roles antioxidante, otras están involucradas en la reparación del daño oxidativo, particularmente el daño a ácidos nucleicos (Brul y Coote, 1999).

Los compuestos con actividad antimicrobiana en la miel podrían generar diversos tipos de estrés inhibiendo o retardando el crecimiento de las bacterias. Esto podría estar en función del tipo de bacteria involucrada y de las posibles interacciones entre los compuestos con actividad.

3. JUSTIFICACIÓN

México posee una amplia biodiversidad, lo que provee de un sin número de compuestos con actividad biológica que pueden ser transportados desde las plantas o flores a la miel por las abejas. Debido a esto, las mieles florales producidas en nuestro país (Campanilla, Cactáceas y Naranja) podrían poseer actividad antioxidante y antimicrobiana destacadas. Los metabolitos secundarios presentes en ellas serían los responsables de dicha actividad y éstos podrían secuestrar radicales libres y quelar metales. Además, las mieles florales en estudio podrían presentar un efecto inhibitorio sobre microorganismos Gram positivos y negativos patógenos en alimentos.

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la composición de metabolitos secundarios y determinar las actividades antioxidante y antimicrobiana en mieles florales: Naranja, Cactáceas y Campanilla

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Selección de material biológico en función de parámetros químicos, actividad antioxidante y antimicrobiana.
- Caracterización de los metabolitos secundarios de tres mieles florales: Campanilla, Cactáceas y Naranja.
- Determinación de la actividad antioxidante y efecto del proceso de digestión *in vitro* en mieles florales (Campanilla, Cactáceas y Naranja).
- Identificación de los compuestos con actividad antimicrobiana de las mieles florales: Campanilla, Cactáceas y Naranja.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Muestras

El Cuadro 8 presenta la información de 14 mieles procedentes de diferentes estados de la República Mexicana. Las primeras cinco muestras fueron obtenidas en comercios establecidos, las nueve restantes se obtuvieron de apicultores de los estados de Oaxaca, Querétaro, San Luis Potosí, Veracruz y el Distrito Federal; en mayo del 2009.

Cuadro 8. Origen floral y nombre científico de mieles mexicanas empleadas en este estudio

<i>Código</i>	<i>Origen floral</i>	<i>Nombre científico</i>	<i>Estado de procedencia</i>	<i>País</i>
<i>Mieles multiflorales</i>				
M1	Multifloral	----	----	México
M2	Multifloral	----	----	México
M3	Multifloral	----	----	México
M4	Multifloral	----	----	México
M5	Multifloral	----	----	México
<i>Mieles uniflorales</i>				
M6	Flor de Campanilla	<i>Campanula persicifolia</i>	Guerrero	México
M7	Flor de cactácea	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Querétaro	México
M8	Flor de Naranja	<i>Citrus sinensis</i>	Querétaro	México
M9	Flor de Naranja	<i>Citrus sinensis</i>	Veracruz	México
M10	Flor de Campanilla	<i>Campanula persicifolia</i>	Oaxaca	México
M11	Flor de cactácea	<i>Opuntia ficus-indica</i>	San Luis Potosí	México
M12	Flor de eucalipto	<i>Eucalyptus globulus labill</i>	Distrito Federal	México
M13	Flor de cuajiniquil	<i>Inca punctata</i> (Willd)	Distrito Federal	México
M14	Flor de eucalipto	<i>Eucalyptus globulus labill</i>	Distrito Federal	México
MM	Manuka	<i>Leptospermum scoparium</i>	----	Nueva Zelanda

5.2 Parámetros de calidad: color, humedad, prolina, acidez libre y total

El color (L, a* y b*) se determinó empleando el sistema CIELAB por el método de reflectancia usando un espectrofotómetro CM 3500D (Konica-Minolta, Mahwah, NJ, USA). Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado y se reportó la media \pm la desviación estándar.

La humedad se determinó empleando el método 969.38 establecido por la AOAC (2001). Se colocaron unas gotas de miel en un refractómetro y se determinaron los °Bx, posteriormente se calculó la humedad empleando las tablas de conversión reportadas para esta técnica. Se reportó la media \pm la desviación estándar de tres datos.

En el caso de la prolina se empleó el método 979.20 establecido por la AOAC (2001). Se mezcló 0.5 mL de miel con 1 mL de ácido fórmico (80 %, v/v), 1 mL de ninhidrina y se agitó vigorosamente durante 15 min. Posteriormente se adicionaron 5 mL de 2-propanol y se dejó enfriar. La absorbancia se determinó a 510 nm. Los mg equivalentes de prolina/kg de miel se calcularon empleando una curva estándar de prolina. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado y se reportó la media \pm desviación estándar. Se empleó para la cuantificación una curva estándar de prolina que fue de 20 a 100 μ L/mL de prolina.

Para determinar la acidez libre y total se empleó el método 962.19 reportado por la AOAC (2001). Se disolvieron 10 g de miel en 75 mL de agua destilada, se mezcló vigorosamente, se tituló con hidróxido de sodio 0.05 N deteniendo la titulación cuando se alcanzó el pH de 8.5, inmediatamente se agregaron 10 mL de hidróxido de sodio 0.05 N y se tituló con ácido clorhídrico 0.05 N hasta alcanzar un pH de 8.3. Se emplearon las siguientes fórmulas para calcular la acidez libre y total:

$$\text{Acidez libre} = \frac{(\text{mL de NaOH } 0.05 \text{ N muestra}) - (\text{mL de NaOH } 0.05 \text{ N blanco})}{(\text{g de muestra})} * 50$$

$$Lactona = \frac{(10 - mL \text{ de HCl } 0.05 \text{ N})}{(g \text{ de muestra})} * 50$$

$$Acidez \text{ total} = acidez \text{ libre} + lactona$$

Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado y se reportaron como la media \pm la desviación estándar.

5.3. Determinación del perfil de azúcares mayoritarios por medio de HPLC

Para determinar el perfil de compuestos sacáridos en la miel se empleó la metodología reportada por Bogdanov *et al.*, 1996 y Bogdanov, 1999. Se tomaron 10 μ L de miel al 20 % (p/v), previamente filtrada, se inyectaron directamente en una columna Spherisorb-Amino 25 x 4.6 cm en un sistema cromatográfico Hewlett-Packard serie 1100 acoplado a un detector de índice de refracción (IR). Como eluyente se usó acetonitrilo al 80 %. La temperatura de la columna y el refractómetro fue de 40 °C. Los azúcares que se emplearon como estándar fueron: fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa, melebiosa y rafinosa. La cuantificación de los compuestos sacáridos se llevó a cabo empleando estándares externos.

5.4. Cuantificación de peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno se determinó en las muestras: miel de Campanilla (M6), Cactáceas (M7) y Naranja (M8) por medio de la técnica citada por Pruneda *et al.* (2008), con algunas modificaciones. El contenido de peróxido de hidrógeno se analizó por medio de la adición de oxisulfato de titanio (IV) [Ti (SO₄)₂] a la muestra problema y los cambios de absorbancia se monitorean empleando un espectrofotómetro. Se colocó 1 mL de miel al 10 % (p/v) y se adicionó 1 mL de [Ti

(SO₄)₂], por último se adicionaron 9 mL de caldo soya tripticasa (CST) para obtener un volumen final de 11 mL. La absorbancia se monitorio a 406 nm y el ensayo se llevó a cabo por triplicado. Se empleó medio de cultivo en lugar de agua para simular las condiciones experimentales de los ensayos microbiológicos.

5.5. Obtención de extractos fenólicos y análogo de azúcares

El proceso de extracción de los compuestos fenólicos de las muestras de miel se adaptó de la metodología propuesta por Baltrusaityte *et al.* (2007). 30 g de miel se disolvieron en 250 mL de agua acidificada (pH 2.0) y se hicieron pasar por una columna con resina Amberlita XAD-2. Los azúcares y los compuestos polares se eluyeron con agua acidificada (250 mL); la columna se lavó posteriormente con 300 mL de agua neutra; y los compuestos fenólicos se recuperaron con metanol (250 mL). Los extractos metanólicos se concentraron y llevaron a sequedad empleando un rotaevaporador, por último se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso.

Para observar la interferencia de los azúcares en la actividad antioxidante de las mieles, se preparó un análogo de azúcares (AA). Se formuló empleando las concentraciones determinadas mediante HPLC: fructosa (39.13 g), glucosa (31.42 g), maltosa (6.55), sacarosa (1.62 g) y agua (21.29 mL), obteniendo en total 100 g del análogo de azúcares.

5.6. Obtención del perfil de metabolitos secundarios mediante HPLC

Para las mieles de Campanilla (M6), Cactáceas (M7) y Naranja (M8) se determinó el perfil de compuestos fenólicos de sus extractos metanólicos por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Se empleó un sistema cromatográfico de alta resolución marca Waters con una bomba cuaternaria de

entrega de disolventes modelo 600 acoplado a un detector de arreglo de diodos marca Waters 2998.

El equipo estaba provisto de un inyector manual Rheodyne 7725i, un degasificador electrónico (Metachem Technologies Inc.). El procesamiento de datos se llevó a cabo usando el programa Empower 2 (Waters). Las condiciones cromatográficas para la determinación se describen a continuación: Columna Zorbax XDB-C18 (5 μm , 4.6 x 250 mm), eluyentes: agua acidificada (A) y acetonitrilo (B), gradiente de concentración (desde 5 a 10 % de B durante 5 min, desde 10 a 50 % de B en 15 minutos y desde 50 a 5 % de B durante 10 minutos), flujo de 1 mL/min, detector: arreglo de diodos, absorbancia: 280 nm y volumen de inyección: 10 μL . Los compuestos fenólicos que se emplearon como estándares fueron: ácido benzoico, ácido siríngico, ácido cinámico, *p*-coumárico, ácido ferúlico, apigenina, luteolina, caempferol, quercetina, rutina, naringenina, hesperetina y catequina. La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó por el método del estándar externo.

5.7. Contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante

5.7.1. Fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu de acuerdo a la metodología descrita por Zalibera *et al.* (2008) con algunas modificaciones. A 50 μL de muestra se le adicionaron 125 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 200 μL de agua destilada. La mezcla se sónico por 5 min y posteriormente se adicionaron 625 μL 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 kg de miel (mg AG/kg \pm DE).

5.7.2. Ensayo del radical ABTS

Se determinó la capacidad antioxidante de las muestras en la reacción con el radical estable ABTS•+ empleando la técnica reportada por Nenadis *et al.* (2004) con modificaciones de Loarca-Piña *et al.* (2010), la cual se describe a continuación. El radical ABTS (2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) se preparó haciendo reaccionar 5 mL de una solución de ABTS 7 mM y 88 μ L de una solución de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) 140 mM. Después de 24 h de reposo se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia inicial de 0.7 ± 1.0 a 734 nm. 25 μ L de la muestra se mezclaron con 230 μ L de la solución de ABTS•+. La absorbancia se determinó a temperatura ambiente después de 0, 4, 10, 30, 60 y 90 min a 734 nm, por triplicado, en un espectrofotómetro. El valor TEAC se calculó empleando una curva de calibración de Trolox y los resultados se expresaron como μ mol equivalentes de Trolox por kg de miel \pm desviación estándar (μ mol Trolox /kg \pm DE). Adicionalmente, se calculó la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de la miel de Campanilla (M6), Cactáceas (M7) y Naranja (M8) en miel completa y en extractos metánolicos, empleando el programa GraphPad Prisma versión 5

5.7.3. Ensayo del radical DPPH

Se determinó la actividad antiradical (ARA) usando el radical estable DPPH de acuerdo al método reportado por Fukumoto y Mazza (2000) con modificaciones de Loarca-Piña *et al.* (2010). En la presencia de un antioxidante se monitoreo el color púrpura del DPPH•, y se observó el cambio de absorbancia espectrofotométricamente. 20 μ L de la muestra disuelta en metanol (miel 10% p/v, 2mg/mL de extracto metanólico) se mezclaron con 200 μ L de una solución del DPPH• al 80% en metanol. La absorbancia se determinó a 520 nm, por triplicado, en un espectrofotómetro. La ARA se calculó empleando una curva de calibración de Trolox y los resultados se expresaron como μ mol equivalentes de Trolox por kg de miel \pm desviación estándar (μ mol Trolox /kg \pm DE). De igual manera que para el

ensayo de ABTS, se calculó la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de la miel de Campanilla (M6), Cactáceas (M7) y Naranja (M8) en miel completa y en extractos metánolicos, empleando el programa GraphPad Prisma versión 5.

5.7.4. Ensayo FRAP

El poder reductor se determinó empleando la metodología propuesta por Firuzi *et al.*, 2005. La técnica se basa 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). Este cambio de coloración puede ser monitoreado por el cambio de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

El reactivo FRAP contenía 1 mL de una solución de TPTZ (2.4.6-tripiridil-1.3.5-triazina) 10 mM, 1 mL de $FeCl_3$ 20 mM y 10 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 175 μ L de la solución FRAP. Se empleó un estándar acuoso de $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ para la curva de calibración y los resultados se expresaron como μ moles equivalente de $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ por kg de miel \pm la desviación estándar. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

5.7.5. Evaluación de la actividad quelante

La actividad quelante se determinó en las mieles de Campanilla (M6), Cactáceas (M7) y Naranja (M8), empleando la técnica reportada por Dinis *et al.*, 1994. Se tomó 150 μ L de $FeCl_2$ 2 mM y se adicionó a 30 μ L de la solución a evaluar (miel completa, 10 %, p/v; extractos metanólicos ,0.5 mg/mL; un análogo de azúcares, 10 %, p/v y prolina, 0.5 mg/mL), a esta mezcla se le adicionaron 60 μ L de ferrozina 5 mM. La mezcla se agitó vigorosamente y se leyó la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro. El porcentaje de quelación se calculó empleando la siguiente fórmula: % Quelación = [(absorbancia del control–absorbancia de la

muestra)/absorbancia de la muestra] X 100. Los resultados se expresaron como eq. de EDTA/g de muestra, las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

5.8. Efecto del proceso de digestión *in vitro* en el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante

5.8.1. Digestión *in vitro*

La mieles de Campanilla (M6), Cactáceas (M7) y Naranja (M8) fueron sometidas a una digestión *in vitro*, empleando la técnica reportada por Dinnella *et al.* (2007) para determinar la bioaccesibilidad de sus 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 bajo agitación constante. Posteriormente, se adicionó 1.5 mL de 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 de la digesta fue incrementado hasta pH 5 con NaHCO₃ 0.9 N y se le agregó 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 hicieron interactuar con un tubo de celulosa que contenía 25 mL de NaCl (9mg/mL). La solución se mantuvo en agitación constante durante 1 h y 37 °C. Para la determinación de fenoles totales y actividad antioxidante se tomó 1 mL de solución dializada (D_{Dentro} , solución dentro del tubo de diálisis) y se sometió a una extracción sólido-líquido.

5.8.2. Extracción sólido-líquido

Para las muestras dializadas (miel de Campanilla, Cactáceas y Naranja) 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 μ L 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 acidificada (pH 2) y 5 mL de agua destilada. Finalmente los compuestos fenólicos se eluyeron con metanol (2 mL).

5.8.3. Evaluación de bioaccesibilidad

La bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos puros en el sistema modelo de miel se analizó por medio de espectrofotometría UV-Vis (Tagliacruzchi *et al.*, 2010). Después del proceso de digestión, las muestras fueron acidificadas, a 1 mL de la solución digerida se le adicionó 1 mL de agua acidificada a pH 2, el agua se acidificó con HCl concentrado. Esta mezcla se hizo pasar por el cartucho de resina C18 y se obtuvo el extracto metanólico. Se midieron las absorbancia a la longitud de absorción máxima de cada uno de los compuestos fenólicos. Las longitudes de onda de absorción máxima fueron 270 nm para ácido gálico, quercetina, rutina y catequina, 290 nm para ácido cinámico

Al someter al proceso de digestión a las mieles florales, la cuantificación de los compuestos fenólicos en la digesta se realizó de manera similar a la de la cuantificación de compuestos fenólicos en el sistema modelo de miel, después de tomar 1 mL de solución digerida y 1 mL de agua acidificada a pH 2, se hizo pasar por el cartucho de resina C18 para obtener el extracto metanólico. Los actividad antioxidante se determinó empleando la metodología reportada por Zalibera *et al.* (2008), A 50 μ L de extracto metanólico se le adicionaron 125 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu y 200 μ L de agua destilada. La mezcla se sónico por 5 minutos y posteriormente se adicionaron 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 kg de miel (mg AG/kg \pm DE).

La concentración de compuestos fenólicos en el equilibrio en la fase dializada (Fenoles- D_{Dentro} EQ) se calculó empleando la siguiente fórmula:

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

donde $Fenoles-D_{Dentro}EQ$ es la concentración de compuestos fenólicos después de la digestión (mg/kg de miel). Para entender de manera más precisa el concepto de solución dializada (D_{Dentro}) se muestra la Figura 4.

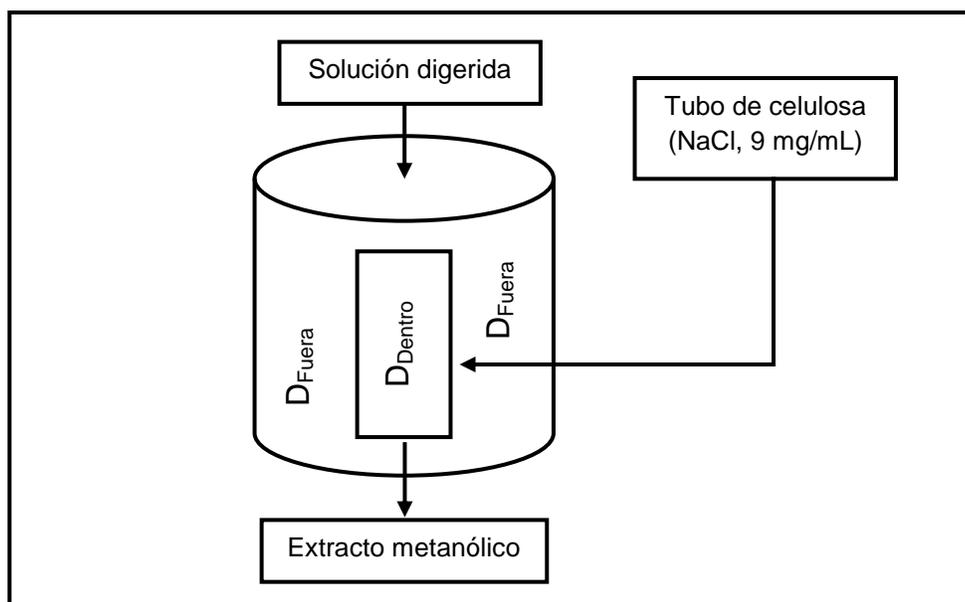


Figura 4. Diagrama del proceso de dializado en la digestión *in vitro*.

El índice de bioaccesibilidad fue calculado tomando en cuenta la siguiente fórmula:

$$\% IB = \frac{100 * FenolesD_{Dentro}}{FenoleD_{Dentro}EQ}$$

5.9. Determinación de la actividad antimicrobiana de mieles mexicanas

Para determinar la actividad antioxidante en las 14 mieles evaluadas se emplearon cuatro cepas: *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Las cepas se mantuvieron a 4°C en agar soya tripticasa inclinado (Difco Laboratories, Sparks, MD, U.S.A.). Se llevaron a cabo tres transferencias sucesivas en caldo soya tripticasa a 37 °C, con intervalos de 24 h. antes de ser empleadas en el análisis. Se prepararon series de diluciones de cada suspensión celular para obtener la concentración deseada (1×10^3 UFC/mL). La población en el inóculo se calculó por medio de vaciado en placa empleando agar soya tripticasa, las placas se incubaron a 35 °C durante 24 h antes de contar las colonias.

Adicionalmente, la miel de Campanilla (M6), Cactáceas (M7), Naranja (M8) y Manuka (MM) fueron seleccionadas para determinar la participación de los compuestos con potencial actividad antimicrobiana presentes en las mieles, para lo cual se emplearon seis microorganismos de interés sanitario. Se les hizo interactuar con miel, extractos metanólicos de miel, miel con catalasa para evitar la formación de peróxido de hidrógeno, peróxido de hidrógeno a las mismas concentraciones a las que se generó al diluir la miel al 10 % (p/v) en caldo soya tripticasa (CST) y un análogo de azúcares (10 %, p/v).

Las cepas seleccionadas fueron tres Gram positivas: *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; y tres Gram negativas: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* O157:H7 F4546 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Las cepas fueron activadas y conservadas de la manera señalada anteriormente.

Los tratamientos empleados para determinar la actividad antimicrobiana en la miel de Campanilla (M6), Cactáceas (M7), Naranja (M8) y Manuka (MM) se muestran en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Microorganismos y tratamientos empleados para la determinación de la actividad antimicrobiana en mieles florales.

<i>Microorganismo</i> (1×10^3 UFC/mL)	<i>Tratamiento</i>	
Gram positivos: <i>Bacillus cereus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Miel (10 %, p/v)	Campanilla Cactáceas Naranja Manuka
Gram negativos: <i>Salmonella</i> Typhimurium <i>Escherichia coli</i> O157:H7 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Extractos (1 µg/g miel)	Campanilla Cactáceas Naranja Manuka
	Catalasa y miel (2700 unidades/g miel)	Campanilla Cactáceas Naranja Manuka
	Peróxido de hidrógeno (ppm)	1165 650 200
	CST	
	Análogo de azúcar (10 %, p/v)	

Las mieles evaluadas se diluyeron en CST al 10 %, p/v. Para los extractos metanólicos se colocaron 1 µg de extracto en 100 µL de metanol y estos fueron adicionados a 9 mL de CST, la concentración se seleccionó en base a los resultados obtenidos en los ensayos preliminares descritos en la sección 6.1.2., que fue un promedio de la concentración de compuestos fenólicos determinados en miel. En el caso de la catalasa, a una mezcla de cada una de las mieles con CST al 10 % (p/v) se le adicionaron 2700 unidades de enzima, con el fin de evitar la formación de peróxido de hidrógeno. El efecto del peróxido de hidrógeno se evaluó a tres concentraciones. El criterio de selección de las concentraciones del peróxido se basó en los resultados descritos en la sección 6.2.3., se eligieron concentraciones similares a las generadas al diluir la miel al 10 % (p/v) en CST (200, 650 y 1165 ppm). Por último, el análogo de azúcares se preparó al 10 % (p/v) diluida también en

CST. Todos los tratamientos se esterilizaron empleando filtros de 220 μm de tamaño de poro.

Las mieles y los tratamientos (200 μL) se colocaron en una placa Bioscreen de 100 fosas (Labsystems Corporation, Helsinki, Finland), se adicionaron 5 μL con el inóculo del microorganismo a una concentración de 1×10^3 UFC/mL. Se monitorearon en un Bioscreen C Analyzer System (Labsystems Corporation) a una temperatura de incubación de 37 °C por 48 h. La densidad óptica se determinó cada 30 min a 620 nm.

Se estimaron los parámetros de la cinética de crecimiento de los microorganismos: velocidad de crecimiento (μ), duración de la fase lag y la densidad de la máxima población (DMP) empleando el programa DMFit (Dinamic Modelling) Version 2.0 elaborado por József Baranyi y Yvan Le Marc del Institute of Food Research, Reino Unido disponible en ComBase (www.combase.cc).

5.10. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos para determinar diferencias entre muestras de tipos de mieles se llevaron a cabo empleando el programa estadístico JMP 5.0.1. Los resultados se expresaron como la media \pm la desviación estándar. Al caracterizar las muestras los resultados se analizaron empleando un análisis descriptivo comparativo. Para determinar la actividad antimicrobiana se estimaron los parámetros de la cinética de crecimiento de los microorganismos: velocidad de crecimiento (μ), duración de la fase lag y la densidad de la máxima población (DMP); empleando el modelo de Baranyi y Roberts (1994) mediante la aplicación DMFit para Excel disponible en el sitio web ComBase (www.combase.cc). Las correlaciones se obtuvieron usando el programa JMP versión 5.0.1 con significancia de $\alpha = 0.05$. Para la elaboración de la gráfica de estrellas se empleó el paquete R versión 2.11.1 (2010 The R Foundation for Statistical Computing www.project-r.org).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Selección de material biológico en función de parámetros químicos, actividad antioxidante y antimicrobiana de mieles mexicanas

6.1.1. Parámetros químicos

Los resultados obtenidos para las 14 mieles mexicanas se observan en el Cuadro 10. Los códigos empleados para cada una de las muestras se describieron en el Cuadro 8. De éstas, 5 fueron mieles multiflorales y 9 monoflorales. Los análisis que se llevaron a cabo para evaluar calidad fueron: color, humedad, contenido de prolina, pH, acidez total y acidez libre. Estos parámetros están relacionados con la madurez de la miel, el método de producción, las condiciones ambientales y el origen floral.

El contenido de humedad de la miel es un factor importante que contribuye a su estabilidad frente a la fermentación y la granulación durante el almacenamiento, puede ser afectada por las condiciones climáticas y el contenido de humedad del néctar floral de procedencia (Nanda *et al.*, 2003). Las muestras analizadas mostraron valores de humedad que van desde 15.5 hasta 20.7 %. La M1 tenía un contenido de humedad superior a la permitida por la norma internacional de miel (20 %) (CA, 2001).

La prolina es el principal aminoácido en la miel y el valor mínimo permitido en mieles genuinas es de 180 mg/kg (CA, 2001). Los valores de prolina en las muestras analizadas fueron de 146.0 a 877.6 mg/kg. Los resultados obtenidos son similares a los reportados para mieles Argentinas (166.0 a 708.0 mg/kg) (Baroni *et al.*, 2009).

Cuadro 10. Parámetros químicos de las 14 mieles mexicanas analizadas¹.

<i>Miel</i>	<i>Humedad</i> (%)	<i>Prolina</i> (mg/kg)	<i>L*</i>	<i>a*</i>	<i>b*</i>	<i>Acidez total</i> (meq/kg)	<i>Acidez libre</i> (meq/kg)
Multifloral							
M1	20.7 ± 0.1	282.8 ± 11.2	24.6 ± 2.0	6.5 ± 1.2	29.6 ± 2.7	21.8 ± 1.0	18.3 ± 0.1
M2	17.6 ± 0.4	369.7 ± 13.6	27.3 ± 0.4	10.5 ± 1.6	36.8 ± 1.1	26.4 ± 0.3	27.7 ± 0.3
M3	16.5 ± 0.3	225.7 ± 20.2	23.2 ± 0.2	15.6 ± 0.3	30.1 ± 2.5	32.6 ± 0.5	32.2 ± 0.9
M4	18.0 ± 0.0	464.5 ± 12.0	25.5 ± 0.5	7.8 ± 0.5	22.1 ± 0.8	32.4 ± 0.4	29.9 ± 0.6
M5	17.8 ± 0.4	359.4 ± 1.4	18.7 ± 0.5	6.0 ± 0.2	18.6 ± 1.3	36.1 ± 0.1	35.8 ± 0.8
Monofloral							
M6	18.5 ± 0.1	441.3 ± 29.1	22.3 ± 0.6	5.7 ± 0.2	24.2 ± 1.0	46.8 ± 3.8	44.4 ± 0.7
M7	17.7 ± 0.6	439.3 ± 8.9	31.6 ± 0.5	7.0 ± 0.2	38.1 ± 1.1	18.8 ± 0.2	19.1 ± 0.5
M8	19.2 ± 0.0	307.7 ± 4.4	14.4 ± 0.8	14.9 ± 0.9	30.9 ± 0.8	39.0 ± 0.8	37.6 ± 0.7
M9	16.5 ± 0.1	305.9 ± 9.3	20.5 ± 0.8	7.5 ± 0.5	32.9 ± 1.6	44.4 ± 4.7	42.9 ± 1.6
M10	16.8 ± 0.1	146.0 ± 2.8	26.1 ± 0.3	8.7 ± 0.2	18.6 ± 1.3	42.2 ± 1.8	39.9 ± 0.9
M11	16.2 ± 0.4	220.5 ± 2.4	27.9 ± 0.5	0.1 ± 0.1	17.2 ± 0.8	13.3 ± 1.3	13.7 ± 0.0
M12	15.5 ± 0.4	387.4 ± 3.7	27.5 ± 0.4	11.1 ± 0.6	35.6 ± 0.2	13.4 ± 1.2	12.5 ± 0.3
M13	18.0 ± 0.1	569.4 ± 2.4	27.5 ± 0.4	13.6 ± 0.1	34.9 ± 0.4	37.9 ± 0.3	38.3 ± 0.2
M14	16.0 ± 0.2	877.6 ± 15.1	24.0 ± 0.8	10.0 ± 0.6	29.5 ± 0.9	27.7 ± 0.2	27.2 ± 0.4

¹Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes ± desviación estándar de tres mediciones sobre la misma muestra de cada tipo de miel.

La acidez de la miel se atribuye a la presencia de ácidos orgánicos y puede ser relacionada con el origen floral y condiciones climáticas (Nanda *et al.*, 2003; Bogdanov *et al.*, 2004). Los valores de acidez total mostraron un intervalo de 13.4 a 46.8 meq/kg. Estos valores fueron similares a los reportados para mieles de la India, Polonia y Tanzania (Nanda *et al.*, 2003; Gidamis *et al.*, 2004; Juszczaek *et al.*, 2009). Los valores de acidez libre en todas las muestras fueron menores a 50 meq/kg (12.5 a 44.4 meq/kg); el cual es el valor máximo permitido de acuerdo al Codex Alimentarius (CA, 2001).

La muestra M10 obtuvo un valor de prolina de 146.0 mg/kg lo que sugiere que esta miel podría provenir de una fuente diferente al néctar de flores o exudados de plantas. El valor podría indicar una posible adulteración, sin embargo, basándose en los análisis de humedad (16.8), acidez total (42.2), acidez libre (39.9) y pH (3.6); podemos suponer que la muestra se encuentra dentro de los parámetros establecidos para una miel genuina. Los valores bajos de prolina podrían deberse al origen floral o las condiciones climáticas.

El color de la miel natural es un indicador de su origen botánico y está fuertemente relacionado con el contenido de los metabolitos secundarios (Bertoncelj *et al.*, 2007). El color de las mieles se determinó utilizando la metodología de CIE Lab y se obtuvieron los valores de L, a* y b*. El valor de L indica las coordenadas de luminosidad (0 = negro y 100 = blanco), los valores de L para las muestras fueron de 14.4 hasta 31.6. La muestra M7 presentó la coloración más clara (31.6), mientras que la muestra M8 presentó la coloración más oscura (14.4). González-Miret *et al.*, (2005) clasificaron la miel en dos grupos desde el punto de vista de la luminosidad: mieles claras $L > 50$, mieles oscuras $L < 50$. En este sentido, las mieles analizadas presentaron coloraciones oscuras. Para la coordenada rojo-verde (a*), valores positivos indican coloraciones que tienden al rojo, en cambio, valores negativos señalan coloraciones que tienden al verde. Los valores obtenidos por las muestras variaron de 0.1 hasta 15.6. Para la coordenada amarillo-azul (b*), los valores positivos muestran coloraciones amarilla y los valores negativos coloraciones azules;

las muestras presentaron valores desde 17.2 hasta 38.1. Estos valores indican una gran proporción de colores rojos y amarillos. El color de la miel es un factor determinante en la aceptabilidad del producto por el consumidor (Viuda-Martos *et al.*, 2010).

6.1.2. Contenido de fenoles totales y propiedades antioxidantes *in vitro*

Existe evidencia que señala que los compuestos fenólicos son responsables de la actividad antioxidante de la miel. Por lo que se decidió determinar el contenido de fenoles totales (mg AG/kg) en muestras completas y en extractos metanólicos (Cuadro 11 y Cuadro 12).

Las mieles analizadas presentaron resultados de contenido total de fenoles en un intervalo de 283.9 a 1142.9 mg AG/kg. Los extractos metanólicos de las muestras de miel mostraron valores entre 79.4 a 522.6 mg AG/kg. La muestra M8 de miel obtuvo los valores mayores de fenoles totales (1142.8 mg AG/kg) y la muestra M11 presentó los valores menores (283.8 mg AG/kg). Valores similares de contenido total de compuestos fenólicos fueron reportados para mieles Croatas (126.0-905.7 mg AG/kg) (Piljac-Zegarac *et al.*, 2009), Burkinesas (325.9-1147.5 mg AG/kg) (Meda *et al.*, 2005) y Portuguesas (132.1-727.7 mg AG/kg) (Bertoncelj *et al.*, 2007). Para las mieles monoflorales, las de flor de Naranja (M8 y M9) y Eucalipto (M12 y M14) mostraron los valores mayores de fenoles totales; las mieles de Campanilla (M6) y Cactáceas (M7 y M11) obtuvieron los valores menores. Para los extractos metanólicos la muestra con los valores mayores fue la muestra M12 (522.0 mg AG/kg) y la M13 (516.5 mg AG/kg), la muestra M6 obtuvo los valores menores (79.4 mg AG/kg).

El contenido de fenoles totales para el análogo de azúcares (AA) fue de 79.3 mg AG/kg de miel, debido a la reacción de los azúcares reductores con el reactivo de Folin. De acuerdo con estos resultados, la contribución del AA al contenido de

fenoles totales es pequeña. Esto podría sugerir que los valores altos de fenoles totales observados en las muestras M8, M9 y M14 de mieles completas, comparado con sus respectivos extractos metanólicos, puede deberse a la presencia de compuestos reductores no-fenólicos, tales como aminoácidos, enzimas u otros compuestos.

Cuadro 11. Fenoles totales y actividad antioxidante de 14 mieles mexicanas analizadas.

Muestra	Fenoles totales mg AG/kg	ABTS	DPPH	FRAP
		$\mu\text{mol Trolox/kg}$		$\mu\text{mol FeSO}_4/\text{kg}$
Multifloral				
AA	79.3 ± 2.2	76.8 ± 4.3	0.0 ± 2.9	182.6 ± 3.6
M1	359.1 ± 30.2	1274.7 ± 34.0	81.9 ± 11.3	897.4 ± 26.9
M2	526.5 ± 34.9	1521.0 ± 51.3	109.1 ± 7.6	1672.4 ± 55.3
M3	751.8 ± 49.3	2261.9 ± 17.9	134.3 ± 8.7	1831.9 ± 28.8
M4	646.1 ± 32.3	1349.2 ± 31.6	109.0 ± 13.6	1010.9 ± 3.1
M5	1088.1 ± 36.0	2030.9 ± 86.7	153.7 ± 4.8	1695.8 ± 58.0
Monofloral				
M6	543.8 ± 62.6	1901.1 ± 14.0	122.4 ± 7.6	1434.4 ± 40.60.1
M7	506.4 ± 44.0	1521.9 ± 27.0	93.6 ± 9.9	1167.4 ± 25.7
M8	1142.9 ± 41.3	2368.7 ± 53.0	211.8 ± 13.6	3097.1 ± 115.3
M9	727.0 ± 14.7	2105.6 ± 97.9	157.4 ± 8.6	1671.1 ± 44.7
M10	1036.4 ± 62.5	1918.4 ± 15.0	106.0 ± 4.2	1113.5 ± 45.7
M11	283.9 ± 24.7	910.2 ± 15.5	94.8 ± 3.7	749.4 ± 27.9
M12	838.6 ± 32.7	1779.5 ± 114.3	200.0 ± 3.4	1480.8 ± 91.1
M13	612.3 ± 18.3	1704.7 ± 25.1	147.9 ± 5.2	2432.1 ± 164.3
M14	913.3 ± 75.5	2927.4 ± 44.6	255.0 ± 1.9	2476.7 ± 39.9

Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes ± desviación estándar de tres mediciones sobre la misma muestra de cada tipo de miel.

Cuadro 12. Fenoles totales y actividad antioxidante de 14 extractos metanólicos de mieles mexicanas.

Muestra	Fenoles totales mg AG/kg	ABTS	DPPH	FRAP
		$\mu\text{mol equi. Trolox/kg}$		$\mu\text{mol FeSO}_4/\text{kg}$
Multifloral				
M1	121.5 ± 9.8	349.7 ± 14.2	24.8 ± 4.7	692.0 ± 37.6
M2	142.5 ± 2.1	366.0 ± 9.2	22.3 ± 2.5	893.9 ± 77.0
M3	198.3 ± 11.4	660.7 ± 16.2	34.0 ± 4.6	1481.7 ± 153.4
M4	105.0 ± 5.6	361.9 ± 8.6	15.5 ± 1.2	673.6 ± 25.7
M5	193.5 ± 9.8	686.2 ± 28.1	25.4 ± 5.3	1276.5 ± 79.3
Monofloral				
M6	79.4 ± 3.4	357.8 ± 7.3	16.6 ± 1.3	625.2 ± 25.70.0
M7	142.5 ± 2.6	393.3 ± 16.3	32.8 ± 3.5	1112.8 ± 61.1
M8	363.8 ± 7.1	1146.1 ± 31.2	75.6 ± 4.0	2646.1 ± 85.6
M9	163.9 ± 10.1	522.3 ± 18.7	24.8 ± 3.4	1236.0 ± 29.0
M10	140.6 ± 10.2	494.9 ± 17.3	16.4 ± 1.9	982.3 ± 23.3
M11	107.2 ± 2.7	241.2 ± 8.3	14.1 ± 1.0	601.1 ± 36.2
M12	522.6 ± 14.8	1402.3 ± 49.4	105.6 ± 3.8	1519.8 ± 163.0
M13	516.5 ± 12.7	1677.0 ± 58.9	73.0 ± 9.4	1306.7 ± 208.6
M14	261.8 ± 8.0	765.6 ± 37.4	46.9 ± 3.4	1681.4 ± 63.8

Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar de tres mediciones sobre la misma muestra de cada tipo de miel.

Como se puede observar para la muestra M10, donde se sugirió una adulteración de acuerdo al contenido de prolina, el contenido de fenoles totales de la miel completa fue 10 veces mayor al obtenido en el extracto metanólico. Lo que indica un número importante de sustancias no fenólicas en la muestra.

Los extractos metanólicos de las mieles de Naranja (M8), Eucalipto (M12) y Cuajiniquil (M13) mostraron un valor mayor de compuestos fenólicos comparado con

resultados reportados para extractos metanólicos de mieles Italianas (60.5-276.0 mg AG/kg) (Pichichero *et al.*, 2009).

Los radicales libres juegan un papel importante en la prevención de enfermedades crónico degenerativas relacionadas al estrés oxidativo (Soobrattee *et al.*, 2005). Por lo que, se llevaron a cabo tres técnicas *in vitro* para determinar la actividad antioxidante. Para determinar actividad secuestrante de radicales libres se realizó el ensayo del radical ABTS y DPPH; para determinar el poder reductor total se llevó a cabo el ensayo de FRAP.

Se calcularon los valores TEAC ($\mu\text{mol Trolox/kg}$) de las muestras de miel y extractos metanólicos, los resultados se muestran en el Cuadro 11 y 12, respectivamente. Las mieles diluidas al 10 % p/v presentaron valores para los ensayos de DPPH y ABTS de 81.9 a 255.0 y 910.2 a 2927.4 $\mu\text{mol Trolox/kg}$ (valores TEAC), respectivamente. La muestra M14 (Eucalipto) mostró la mayor actividad antioxidante. Soluciones de extracto metanólico (2mg/mL) mostraron valores para el ensayo de DPPH y ABTS de 14.1 a 105.6 y 241.2 a 1677.0 $\mu\text{mol Trolox/kg}$ (valores TEAC), respectivamente. El extracto metanólico de la muestra M12 (Eucalipto) presentó los mayores valores en ambos ensayos. En el caso del AA, los valores de actividad antioxidante fueron bajos comparados con las muestras analizadas (0.0 y 76.8 $\mu\text{mol Trolox/kg}$).

Para determinar el poder reductor total se realizó el ensayo FRAP. Como se puede observar en el Cuadro 11 y 12, los valores obtenidos fueron desde 897.4 a 3097.1 y 692.0 a 2646.1 $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{kg}$ para la miel y el extracto metanólico, respectivamente.

Los valores TEAC de las mieles en el ensayo de ABTS fueron mayores comparados con los reportados para mieles Eslovacas (180.0-1110.0 $\mu\text{mol Trolox/kg}$, respectivamente) (Zalibera *et al.*, 2008; Álvarez-Suarez *et al.*, 2010). Los valores de las mieles bajo estudio obtenidos con los ensayos de ABTS y FRAP fueron similares a los reportados para mieles Cubanas (210 a 2940 $\mu\text{mol Trolox/kg}$ y 130 a 1960 μmol

FeSO₄/kg, respectivamente) (Álvarez-Suarez *et al.*, 2010). En lo que respecta a los extractos metanólicos los valores obtenidos en el ensayo FRAP fueron similares a los reportados para extractos de mieles Italianas (1200-4400 μmol FeSO₄/kg) (Pichichero *et al.*, 2009). Para los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP, no se observaron correlaciones entre la actividad antioxidante de las mieles y sus extractos metanólicos. Los resultados sugieren que en las mieles estudiadas existen otros compuestos además de los metabolitos secundarios que poseen actividad antioxidante; estos compuestos podrían ser enzimas, ácido ascórbico, entre otros.

6.1.3. Propiedades antimicrobianas

Las propiedades antimicrobianas de las mieles diluidas (10% p/v) fueron determinadas empleando microorganismos patógenos de interés sanitario: *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* y *S. aureus*. Se empleó la curva de crecimiento microbiano y se calcularon los valores de velocidad de crecimiento (μ , DO/h), duración de la fase lag (h) y densidad de la máxima población (DMP, DO) (Figura 5).

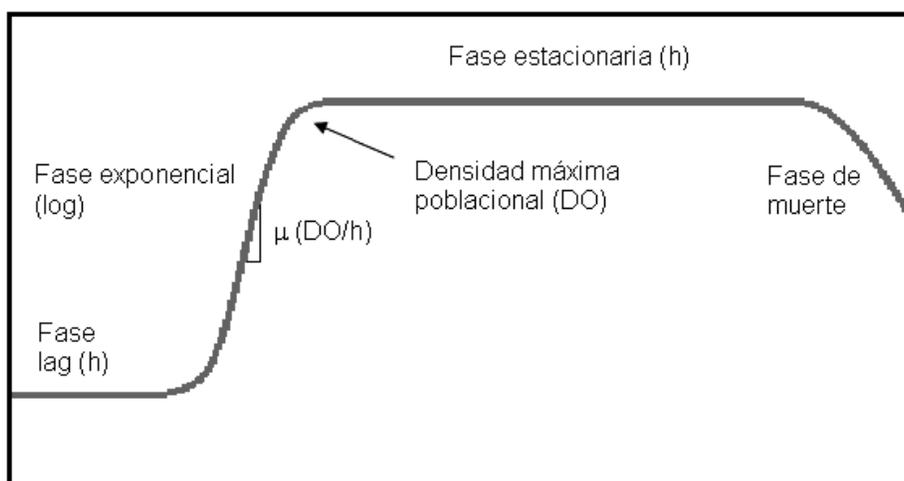


Figura 5. Curva de crecimiento microbiano

Todas las mieles inhibieron por completo el crecimiento de *B. cereus*. Las mieles con la mejor actividad antimicrobiana fueron la M6 (Campanilla), M10 (Campanilla), M9 (Naranja) y M14 (Eucalipto); todas ellas inhibieron el crecimiento de los 4 microorganismos evaluados (Cuadro 13).

La sensibilidad de los microorganismos a la actividad antimicrobiana de la miel siguió el orden que a continuación se señala: *B. cereus* > *L. monocytogenes* > *S. Typhimurium* > *S. aureus*. En general, cuando no se observó una inhibición completa del microorganismo, la presencia de miel en el caldo soya tripticasa afectó al menos uno de los parámetros evaluados: duración de la fase lag, reducción de la velocidad de crecimiento o la DPM.

En promedio, la duración de la fase lag fue de 17.5, 6.4 y 10.9 h para *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* y *S. aureus*, respectivamente. Los resultados obtenidos para la velocidad de crecimiento fueron 0.150, 0.081 y 0.100 DO/h para *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* y *S. aureus*, respectivamente. Los valores obtenidos para la DMP fueron de 0.5 a 0.6 de DO. No se observó una fase estacionaria estable para *S. Typhimurium* en la presencia de las mieles M1, M4, M5, M8 y M11 y sin un crecimiento del microorganismo continuó hasta el final del estudio (48 h).

En estudios previos, la miel ha mostrado poseer actividad antimicrobiana. Esta se atribuye a la alta concentración de azúcares y la baja actividad de agua, a la presencia de peróxido de hidrógeno generado por la enzima glucosa-oxidasa, y a los compuestos no-peróxidos como los compuestos fenólicos (Mundo *et al.*, 2004). Se han descrito previamente estudios que señalan la inhibición del crecimiento de bacterias de interés clínico, tales como: *S. aureus*, *E. coli* y *S. Typhimurium* (Shamala *et al.*, 2002; Miorin *et al.*, 2003; Vorlova *et al.*, 2005).

S. aureus posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades. Causa intoxicación al comer alimentos donde se encuentran liberadas enterotoxinas y puede producir el síndrome de shock tóxico por

Cuadro 13. Actividad antimicrobiana de 14 mieles mexicanas

Miel	Microorganismo								
	<i>Listeria monocytogenes</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Salmonella Typhimurium</i>		
	μ (OD/h)	lag (h)	DMP (OD)	μ (OD/h)	lag (h)	DMP (OD)	μ (OD/h)	lag (h)	DMP (OD)
Multifloral									
M1	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a	0.1 ± 0.0	13.1 ± 0.4	0.7 ± 0.0	0.1 ± 0.0	5.9 ± 0.5	0.7 ± 0.0 ^b
M2	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a	0.1 ± 0.0	14.6 ± 0.7	0.6 ± 0.0	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a
M3	0.2 ± 0.0	18.4 ± 0.5	0.6 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.2 ± 0.9	0.5 ± 0.0	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a
M4	0.0 ± 0.0	12.0 ± 0.5	0.5 ± 0.1	0 ^a	> 48 ^a	0.4 ^a	0.1 ± 0.0	5.5 ± 0.5	0.7 ± 0.0 ^b
M5	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a	0.1 ± 0.0	12.6 ± 0.4	0.6 ± 0.0	0.1 ± 0.0	7.3 ± 0.4	0.5 ± 0.0 ^b
Monofloral									
M6	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.3 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a
M7	0.3 ± 0.2	18.6 ± 2.1	0.5 ± 0.0	0.1 ± 0.0	14.1 ± 0.6	0.7 ± 0.0	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a
M8	0.2 ± 0.1	19.6 ± 1.2	0.5 ± 0.0	0.0 ± 0.0	8.8 ± 0.3	0.8 ± 0.0	0.0 ± 0.0	4.0 ± 1.4	0.7 ± 0.0 ^b
M9	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.3 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a
M10	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.3 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a
M11	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a	0.1 ± 0.0	11.2 ± 0.4	0.7 ± 0.0	0.1 ± 0.0	6.2 ± 0.5	0.7 ± 0.0 ^b
M12	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a	0.1 ± 0.0	9.6 ± 0.4	0.5 ± 0.0
M13	0.2 ± 0.1	19.1 ± 2.1	0.5 ± 0.0	0.1 ± 0.0	10.7 ± 0.3	0.6 ± 0.0	0.1 ± 0.0	7.0 ± 0.3	0.6 ± 0.0
M14	0 ^a	> 48 ^a	0.16 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a

Los resultados son la media de 3 experimentos independientes ± DE. DO = densidad óptica, lag = duración de la fase lag (h), μ = velocidad de crecimiento, DMP = densidad máxima poblacional, ^ano se observó desarrollo, ^bno se obtuvo una fase estacionaria definida.

la liberación de superantígenos en el torrente sanguíneo (Howe *et al.*, 1996; Kanafani y Flower, 2006). La acción de la miel sobre este microorganismo se ha documentado previamente (Miorin *et al.*, 2003; Mundo *et al.*, 2004; Estrada *et al.*, 2005; Vorlova *et al.*, 2005; Patton *et al.*, 2006; Basson y Globber, 2008; Al-Naama, 2009); sin embargo, los reportes muestran respuestas contradictorias en cuanto a la susceptibilidad de *B. cereus*. Algunos autores señalan una susceptibilidad marcada, en cambio otros describen que posee un cierto grado de resistencia (Mundo *et al.*, 2004; Patton *et al.*, 2006). En este estudio, *B. cereus* fue el microorganismo con mayor sensibilidad a las mieles mexicanas analizadas ya que no se observó desarrollo en ninguna de las condiciones ensayadas

En altas concentraciones (50-100 %, p/v) la miel presenta una actividad antimicrobiana en contra de *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*. En algunos casos, *L. monocytogenes* ha mostrado una resistencia marcada (Estrada *et al.*, 2005). El hecho de que no se haya observado una fase estacionaria definida para *S. Typhimurium* al ponerse en contacto con las muestras M1, M4, M5, M8 y M11, puede atribuirse a la reducción de compuestos con actividad antimicrobiana por la acción bacteriana, seguida del desarrollo de algunos microorganismos estresados que han sobrevivido.

En la mayoría de los estudios realizados para determinar la actividad antimicrobiana de la miel se han empleado los ensayos de difusión en discos o fosas. Estos ensayos muestran baja sensibilidad y la miel generalmente se evalúa a altas concentraciones (50-100 %, p/v), además de observarse un crecimiento lento del patógeno, probablemente debido al efecto osmótico (Mundo *et al.*, 2004; Estrada *et al.*, 2005; Vorlova *et al.*, 2005; Patton *et al.*, 2006; Mercan *et al.*, 2007). En comparación, la actividad antimicrobiana de las mieles en estudio se evaluó en suspensión en caldo soya tripticasa a una concentración del 10 % p/v, y la inhibición de los microorganismos se observó claramente. La turbidez se midió usando la metodología reportada por McMeekin *et al.* (1993) y Augusti *et al.* (1999) para estimar los parámetros de crecimiento bacteriano como una alternativa al recuento tradicional.

6.1.4. Estudio estadístico de asociaciones

Para observar el efecto del contenido de compuestos fenólicos en las propiedades químicas y en la actividad antioxidante, se llevó a cabo un estudio de regresión usando una técnica de selección de variables “stepwise”. Los parámetros analizados fueron: propiedades químicas (contenido de prolina, humedad, parámetros de color, acidez total y libre, y pH) y contenido de fenoles totales sobre los ensayos de actividad antioxidante (ensayo ABTS, DPPH y FRAP). Los resultados se muestran a continuación en forma de ecuaciones de regresión:

$$\hat{\text{ABTS}} = 408.38 + 1.11 P + 1.38 TP$$

(p = 0.04) (p = 0.01)

$$R^2 = 0.70$$

$$\hat{\text{DPPH}} = 224.42 - 9.89 H + 0.13 P - 6.81 L^* + 2.02 a^* + 48.96 \text{ pH}$$

(p = 0.01) (p = 0.00) (p = 0.00) (p = 0.05) (p = 0.00)

$$R^2 = 0.96$$

$$\hat{\text{FRAP}} = 224.42 + 1.47 P - 70.41 L^* + 89.99 a^*$$

(p = 0.01) (p = 0.01) (p = 0.00)

$$R^2 = 0.83$$

donde: H =humedad, P = prolina, L* = luminosidad, a* = coordenada rojo-verde, TP = contenido de fenoles totales.

El contenido de fenoles totales y la prolina presentaron un efecto positivo sobre los valores de actividad antioxidante obtenidos en el ensayo de ABTS. Para el ensayo de DPPH, la prolina, las coordenadas verde-rojo y el pH presentaron un efecto positivo, la humedad y la luminosidad presentaron un efecto negativo. En el

caso del ensayo de FRAP, la prolina y las coordenadas rojo-verdes tuvieron un efecto positivo, y la luminosidad un efecto negativo.

En estudios previos se ha observado una correlación positiva entre prolina y la actividad antioxidante en mieles procedentes de Burkina Fasan (Meda *et al.*, 2005a). Se podría esperar una correlación entre el color y la actividad antioxidante, debido a que el color de la miel proviene de los pigmentos y estos a su vez son los principales responsables de la actividad antioxidante (Bertoncelj *et al.*, 2011). El contenido de prolina y compuestos fenólicos contribuyen a la actividad antioxidante de las mieles analizadas. Otros estudios han reportado resultados similares (Beretta *et al.*, 2005; Meda *et al.*, 2005a; Vela *et al.*, 2007; Al *et al.*, 2009; Pichichero *et al.*, 2009).

Con el propósito de obtener una perspectiva multivariable, se obtuvo un esquema descriptivo que incluyó los resultados de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las mieles analizadas, los resultados se observan en la Figura 6. En esta, cada una de las líneas representa un valor relativo de un parámetro medido. Por ejemplo, la línea “A” representa el contenido de fenoles totales y es mayor para la muestra M8 y menor para la muestra M11. Esto significa que la muestra M8 y M11 obtuvieron los mayores y menores contenidos de fenoles totales, respectivamente.

Se puede observar que existen diferencias claras entre las mieles analizadas. La muestra M14 (Eucalipto) obtuvo el perfil más interesante debido a su actividad biológica, seguida de la muestra M9 (Naranja) y M10 (Campanilla). La muestra M6 (Campanilla) presentó la actividad antioxidante menor, sin embargo su actividad antimicrobiana fue buena, inhibiendo el crecimiento de los 4 microorganismos evaluados. La muestra M8 (Naranja) presentó actividad antioxidante destacada, sin embargo no se observó ningún efecto en lo que respecta a la actividad antimicrobiana. Las muestras M12 (Eucalipto), M5 (Multifloral) y M2 (Multifloral) presentaron una moderada actividad antioxidante y un efecto antimicrobiano importante. Por último, las muestras M1 (Multifloral), M4 (Multifloral) y M11 (Cactácea) son las mieles que presentan una actividad biológica limitada.

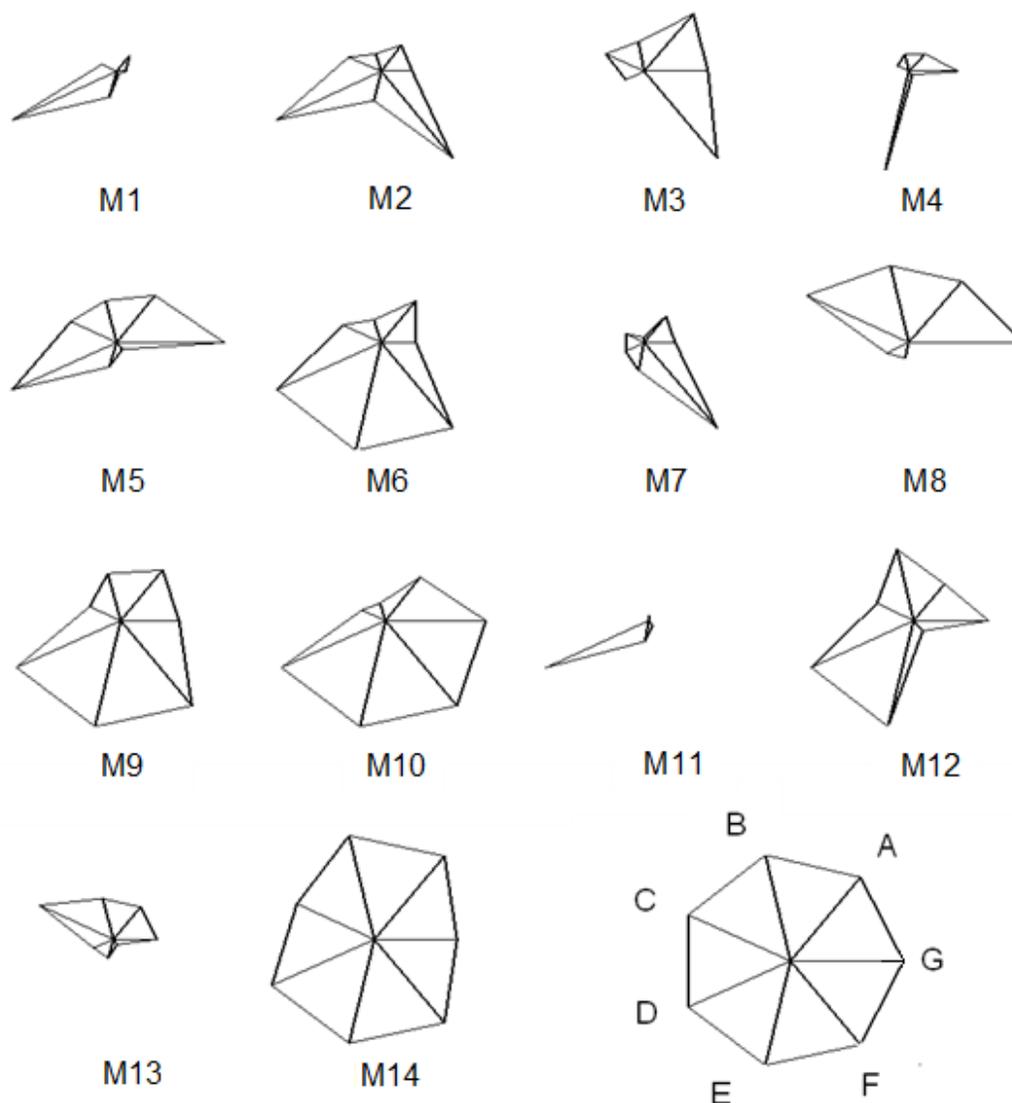


Figure 6. Representación esquemática de los perfiles antioxidantes y antimicrobianos de 14 mieles mexicanas. A = mg AG/kg, fenoles totales; B = $\mu\text{mol Trolox/kg}$, ensayo del ABTS; C = $\mu\text{mol Trolox/kg}$, ensayo del DPPH; D = $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{kg}$, ensayo FRAP; E = Act. vs *Listeria monocytogenes*, fase lag; F = Act. vs *Staphylococcus aureus*, fase lag; G = Act. vs *Salmonella Typhimurium*, fase lag.

Con base en los resultados obtenidos, se seleccionaron tres muestras de mieles para continuar los estudios. La muestra M6 se seleccionó por ser una miel ámbar clara que presentaba destacada actividad antimicrobiana, la muestra M7 se

seleccionó por ser una miel de coloración ámbar y presentar ciertas limitaciones en lo que respecta a las propiedades biológicas, y por último, se seleccionó la muestra M8 con una coloración ámbar oscura y destacada actividad antioxidante.

6.2. Caracterización química de tres mieles florales: Campanilla, Cactáceas y Naranjo

6.2.1. Perfil de metabolitos secundarios en mieles florales

La composición química de la miel depende del origen floral, condiciones geográficas, de procesamiento y de almacenamiento (Saxena *et al.*, 2010). Las propiedades biológicas están fuertemente ligadas a la composición química, en particular la actividad antioxidante es atribuida a compuestos tales como enzimas, carotenoides, aminoácidos, ácidos orgánicos, productos de la reacción de Maillard y principalmente a los compuestos fenólicos. Se han reportado más de 150 compuestos fenólicos en miel que incluyen Flavonoides y ácidos fenólicos (Gheldof *et al.*, 2002; Meda *et al.*, 2005a; Ferreira *et al.*, 2009).

Debido a las propiedades biológicas que los compuestos fenólicos confieren a la miel se decidió obtener el perfil de éstos en las muestras en estudio, por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Los resultados se muestran en el Cuadro 14. Se identificaron 5 ácidos fenólicos (ácido benzoico, siríngico, cinámico, *p*-cumárico y ferúlico) y 8 flavonoides (apigenina, luteolina, caempferol, quercetina, rutina, narangenina, hesperetina y catequina).

El perfil de compuestos fenólicos para las tres muestras fue similar. Los compuestos que se encontraron en mayor proporción fueron la catequina, rutina, quercetina, apigenina, ácido benzoico, ácido siríngico y ácido ferúlico.

Cuadro 14. Perfil de compuestos fenólicos de mieles florales (Campanilla, Cactáceas y Naranja).

<i>Compuesto fenólico</i>		<i>Campanilla*</i>	<i>Cactáceas*</i>	<i>Naranja*</i>
Ácidos benzoicos	Ácido benzoico	6.42 ± 0.50	4.80 ± 0.92	8.43 ± 2.74
	Ácido siríngico	6.50 ± 0.49	6.52 ± 1.03	8.15 ± 0.31
	Ácido cinámico	0.01 ± 0.00	0.17 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Ácido cinámicos	Ácido <i>p</i> -cumárico	7.90 ± 0.71	ND	ND
	Ácido ferúlico	2.51 ± 0.32	13.76 ± 1.20	1.35 ± 0.17
Flavonas	Apigenina	30.12 ± 6.64	20.87 ± 1.88	ND
	Luteolina	1.99 ± 0.02	7.94 ± 1.10	ND
Flavonoles	Caempferol	0.46 ± 0.08	0.15 ± 0.03	1.80 ± 1.43
	Quercetina	13.20 ± 0.99	38.85 ± 4.44	30.93 ± 1.96
Flavonol glucósilado	Rutina	18.38 ± 4.69	63.99 ± 9.37	81.66 ± 5.46
Flavanonas	Naringenina	0.48 ± 0.04	0.16 ± 0.11	1.11 ± 0.12
	Hesperetina	0.01 ± 0.00	0.10 ± 0.02	ND
Flavanoles	Catequina	327.17 ± 28.12	248.23 ± 79.49	161.56 ± 9.74

ND = No detectado

*µg/100 g de miel

La miel de Campanilla presentó el mayor número de compuestos identificados (13) siendo la catequina el compuesto mayoritario (327.17 µg/100 g), seguido de la apigenina (30.12 µg/100 g), rutina (18.38 µg/100 g), quercetina (13.20 µg/100 g), ácido *p*-cumárico (7.90 µg/100 g), ácido siríngico (6.50 µg/100 g) y ácido benzoico (6.42 µg/100 g).

En la miel de Cactáceas de los 13 estándares utilizados se identificaron 12, el ácido *p*-cumárico no estuvo presente. Nuevamente la catequina fue el compuesto mayoritario (248.23 µg/100 g), seguido de la rutina (63.99 µg/100 g), quercetina (38.85 µg/100 g), apigenina (20.87 µg/100 g), ácido ferúlico (13.76 µg/100 g), luteolina (7.94 µg/100 g) y ácido benzoico (6.62 µg/100 g).

Para la miel de Naranja se identificaron 9 compuestos; el compuesto mayoritario fue la catequina (161.56 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), seguido de la rutina (81.66 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), quercetina (30.93 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), ácido siríngico (8.43 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) y ácido benzoico (8.15 $\mu\text{g}/100\text{ g}$). El ácido *p*-coumárico, la luteolina, la hesperetina y la apigenina no se identificaron en este ensayo.

Los ácidos fenólicos como el ácido siríngico (110-820 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), el ácido cumárico (280-2370 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) y el ácido ferúlico (110-810 $\mu\text{g}/100\text{ g}$); los flavonoides como quercetina (190-1300 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), luteolina (140-3190 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) y caempferol (20-160 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) han sido reportados previamente en mieles Australianas (Yao *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2005).

6.2.2. Perfil de azúcares mayoritarios en miel de Campanilla, Cactáceas y Naranja

Con el objetivo de formular un análogo de azúcares como control para los experimentos de actividad antioxidante, antimicrobiana y evaluación de biodisponibilidad, se determinó el perfil de azúcares mayoritarios en las mieles por medio de HPLC. Los resultados se muestran en el Cuadro 15. Se identificaron dos monosacáridos (fructosa y glucosa), tres disacáridos (sacarosa, maltosa y melibiosa) y un trisacárido (rafinosa).

La miel es una solución sobresaturada de azúcares, está constituida principalmente por fructosa (38 %) y glucosa (31 %) (Gheldof *et al.*, 2002; Al *et al.*, 2009; Viuda-Martos *et al.*, 2010). En las mieles objeto de estudio, la fructosa presentó los mayores contenidos (37.18-40.24 $\text{g}/100\text{ g}$), siguiendo glucosa (31.01-31.88 $\text{g}/100\text{ g}$), maltosa (5.67-7.48 $\text{g}/100\text{ g}$), sacarosa (1.60-2.07 $\text{g}/100\text{ g}$), rafinosa (0.32- 2.68 $\text{g}/100\text{ g}$) y melibiosa (0.28- 0.45 $\text{g}/100\text{ g}$). Los resultados obtenidos al evaluar el contenido de los monosacáridos (fructosa y glucosa) y disacáridos (maltosa y sacarosa) se encuentran dentro del intervalo reportado para mieles

Rumanas (fructosa 20-45 g/100 g, glucosa 21-45 g/100 g, maltosa 0-5 g/100 g y sacarosa 0-2 g/100 g) (Al *et al.*, 2009).

Cuadro 15. Perfil de azúcares en mieles florales.

	<i>Miel (g/100 g)</i>		
	<i>Campanilla</i>	<i>Cactáceas</i>	<i>Naranja</i>
Fructosa	40.24 ± 1.40	41.76 ± 1.68	37.18 ± 1.22
Glucosa	31.01 ± 0.29	31.62 ± 0.37	31.88 ± 0.53
Maltosa	5.67 ± 0.16	5.89 ± 0.23	6.78 ± 0.44
Sacarosa	1.88 ± 0.08	1.60 ± 0.19	2.07 ± 0.38
Melibiosa	0.28 ± 0.00	0.40 ± 0.01	0.40 ± 0.01
Rafinosa	0.32 ± 0.08	2.42 ± 0.40	0.40 ± 0.18
(F + G)*	71.00 ± 1.67	73.38 ± 1.33	69.06 ± 0.69
(F/G)	1.31 ± 0.04	1.32 ± 0.07	1.17 ± 0.06

*F = fructosa, G = glucosa

La miel de Cactáceas presentó el mayor contenido de fructosa. La miel de Naranja obtuvo el mayor contenido de glucosa, sacarosa y maltosa.

Los disacáridos y trisacáridos se generan a partir de la acción de las enzimas presentes en la miel durante el almacenamiento, por lo que la notable variación de la rafinosa puede estar ligada al tiempo de almacenamiento (Juszczak *et al.*, 2009).

El Consejo de la Unión Europea (Council of the European Union, 2002) señala que las mieles de origen natural deben presentar valores de sacarosa menores a 5 g/100 g de miel y que la suma de los azúcares fructosa y glucosa (F+G)* debe ser mayor a 60 g/100 g de miel. En el caso de la sacarosa, las mieles analizadas presentan valores de 1.60 hasta 2.07 g/100 g de miel. La formación de la sacarosa en la miel se produce probablemente por medio de una reacción de

transglucosilación que se inicia por la transferencia de una unidad de α -D-glucopiranosil de la sacarosa a una molécula receptora (Da Costa Leite *et al.*, 2000). La sacarosa es el azúcar de mayor importancia desde el punto de vista legislativo (aceptación o rechazo de la muestra) (Ouchemoukh *et al.*, 2010). Para (F+G)^{*} los valores fueron de 69.06 hasta 71.00 g/100g de miel, reafirmando con esto que las mieles analizadas son de origen natural.

Por último, se analizó el cociente fructosa/glucosa (F/G), este parámetro proporciona información acerca del estado de cristalización de la miel, el proceso de cristalización de la miel se favorece a menor contenido de fructosa (Al *et al.*, 2009). Los valores obtenidos fueron desde 1.17 hasta 1.32, lo que nos indica que la miel de Naranja (1.17) presentará mayor tendencia a cristalizar que las mieles de Campanilla (1.31) y Cactáceas (1.32). Los valores obtenidos son similares a los reportados para mieles Argelinas (1.11 a 1.36) (Ouchemoukh *et al.*, 2010)

6.2.3. Cuantificación de peróxido de hidrógeno

La determinación del peróxido de hidrógeno se llevó a cabo debido a que éste es uno de los principales compuestos con actividad antimicrobiana en la miel. Se produce al oxidarse la glucosa por la acción de la enzima glucosa-oxidasa, la cual es activada después de que la miel es diluida (Iurlina y Fritz, 2005).

Como se señaló en la metodología el caldo soya tripticasa (CST) fue empleado para diluir la miel, esto estuvo influenciado por la necesidad de simular las condiciones en las cuales los ensayos microbiológicos se llevaron a cabo. Para la evaluación microbiológica se tomaron 200 μ L de una mezcla miel-CST 10 % (p/v) y se le colocaron 5 μ L del inóculo, la curva de crecimiento del microorganismo fue monitoreada por 48 h. Por esto, la cuantificación del peróxido de hidrógeno se llevó a cabo en los tiempos 0, 2, 8, 24, 36 y 48 h. Los resultados se muestran en la Figura 7.

La concentración de peróxido de hidrógeno fue máxima a las 36 horas de monitoreo, durante las primeras 8 horas no se observaron diferencias significativas entre muestras y fue a las 24 horas que la velocidad de producción se incrementó, pasadas las 36 horas la concentración de peróxido de hidrogeno decayó considerablemente.

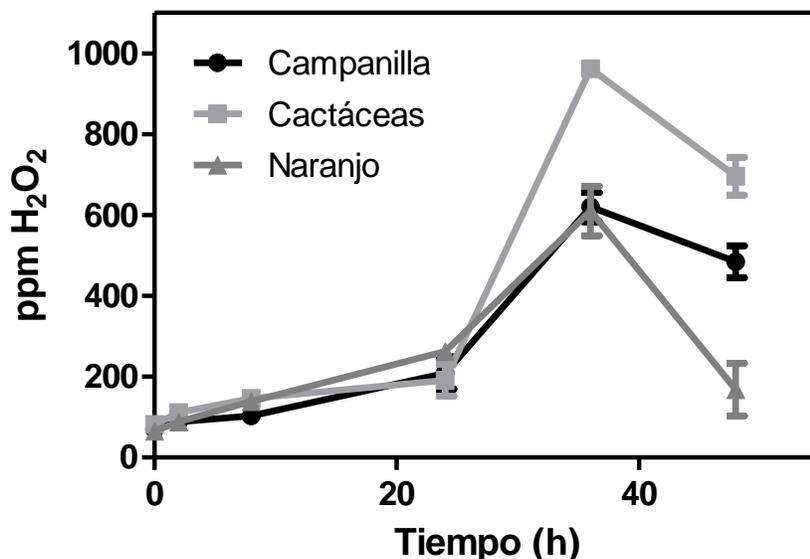


Figura 7. Cuantificación de peróxido de hidrógeno en 48 horas en miel de Campanilla, Cactáceas y Naranja (promedios \pm barra de desviación estándar)

La miel de Cactáceas presentó la mayor producción de peróxido de hidrógeno (962 ppm H₂O₂), seguida de la miel de Campanilla (619 ppm H₂O₂) y Naranja (609 ppm H₂O₂). Los valores de peróxido de hidrógeno obtenidos en las primeras 8 horas de monitoreo son similares a los reportados para mieles Brasileñas (9-214 ppm H₂O₂) (Franchini *et al.*, 2008). El comportamiento observado durante este ensayo ha sido observado previamente (Bang *et al.*, 2003). La velocidad de generación del peróxido de hidrógeno producido por la glucosa oxidasa depende en gran medida de que la miel este diluida, no se sabe a ciencia cierta porque en mieles no diluidas la producción de peróxido de hidrógeno es casi nula (Bang *et al.*, 2003). Después de 36 horas la producción de peróxido de hidrógeno disminuyó, debido probablemente a

que la tasa de consumo de oxígeno de la enzima glucosa oxidasa decrece con el tiempo (Bang *et al.*, 2003).

6.2.4. Contenido de prolina en las mieles en estudio

En general, el contenido de aminoácidos en la miel es bajo, alrededor de 10 a 200 mg/100 g de miel, siendo el aminoácido más importante la prolina; desde el punto de vista cuantitativo representa casi el 50% de éstos (Pérez *et al.*, 2007). El contenido de prolina es empleado para distinguir mieles genuinas de miel que se produce con una fuente diferente a la natural, el valor mínimo aceptado es de 180 mg/kg de miel (Baroni *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 16.

Cuadro 16. Contenido de prolina en mieles florales

<i>Miel (mg Eq. prolina/kg de miel)</i>		
Campanilla	Cactáceas	Naranja
505.00 ± 3.76	575.92 ± 12.00	333.88 ± 14.29

La miel con mayor contenido de prolina fue la miel de Cactáceas (575 mg/kg), seguida de la miel de Campanilla (505 mg/kg) y la miel de Naranja (333.88 mg/kg). Los valores obtenidos para las muestras analizadas son similares a los reportados para mieles Burkinesas (440-2200 mg/kg) y Sudanesas (380-750 mg/kg) (Meda *et al.*, 2005b; Mohammed y Babiker, 2010). Se ha observado que el contenido de prolina puede variar considerablemente entre diferentes mieles (Bogdanov *et al.*, 1999). Este aminoácido es sintetizado por las plantas como metabolito secundario para la protección contra el estrés oxidativo, causado por factores como estrés por frío y por peróxido de hidrógeno (Kumar y Kumar-Yadav, 2009; Ozden *et al.*, 2009).

Se encuentra en la miel debido probablemente a que las abejas lo transportan a ella proveniente del néctar de flores y exudados de plantas.

Los valores obtenidos por las mieles estudiadas exceden al valor mínimo requerido para considerar a la miel como no-adulterada (180 mg/kg). Reafirmando lo ya observado al analizar el perfil de azúcares, las mieles empleadas para este estudio son mieles que provienen de fuentes naturales y no fueron adulteradas desde la etapa de cosecha hasta su análisis.

6.3. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de mieles florales (Campanilla, Cactáceas y Naranja) antes y después de un proceso de digestión *in vitro*

6.3.1. Fenoles totales y actividad antioxidante en mieles florales, extractos metanólicos, un análogo de azúcares (AA) y prolina

En los últimos años, se han identificado una serie creciente de compuestos que muestran el potencial antioxidante de la miel de abeja. Entre éstos se encuentran los compuestos fenólicos (Muñoz y Copaja, 2007) y algunos aminoácidos entre los que destaca la prolina (Bogdanov, 1997). Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios que corroboraren que los metabolitos secundarios presentes en mieles florales mexicanas poseen un efecto antioxidante.

Por lo que se evaluó el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante *in vitro* de mieles florales (Campanilla, Cactáceas y Naranja), extractos metanólicos, prolina y un análogo de azúcares.

Los resultados obtenidos al cuantificar el contenido de fenoles totales en las muestras se presentan en el Cuadro 17. El contenido de fenoles totales de las muestras de miel fue de 495.67 a 1142.88 mg AG/kg de miel. La miel de Naranja presentó los mayores resultados (1142.88), seguida de la miel de Cactáceas

(506.36) y Campanilla (495.67). Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados para mieles Hindúes (470-980 mg AG/kg) y mieles Rumanas (20-1250 mg AG/kg) (Saxena *et al.*, 2010; Al., *et al.*, 2009).

Para relacionar el efecto de los compuestos fenólicos en la actividad antioxidante se determinó el contenido de fenoles totales en extractos metanólicos. Los resultados se muestran en el Cuadro 17.

Cuadro 17. Contenido de fenoles totales en mieles florales, extractos metanólicos, un análogo de azúcares y prolina.

<i>Muestras</i>	<i>Fenoles totales (mg AG/kg)</i>
Análogo de azúcares	79.29 ± 2.20
Prolina	3.98 ± 2.50
Campanilla	495.67 ± 10.40
Cactáceas	506.36 ± 44.00
Naranja	1142.88 ± 41.30
Campanilla (extracto)	61.50 ± 7.60
Cactáceas (extracto)	142.48 ± 2.60
Naranja (extracto)	363.75 ± 7.10

El extracto metanólico de la miel de Naranja presentó el valor mayor (363.75 mg AG/kg), seguida del extracto de miel de Cactáceas (142.48 mg AG/kg) y de Campanilla (61.50 mg AG/kg). Los resultados obtenidos son similares a los reportados para extractos de mieles Italianas (60-280 mg AG/kg) y Portuguesas (132-204 mg AG/kg) (Pichichero *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2009).

Se puede observar una disminución considerable de los compuestos fenólicos presentes en las mieles en comparación con los encontrados en los extractos metanólicos. Para la miel de Campanilla fue de 495.75 a 61.50 mg AG/kg, para la miel de Cactáceas de 506.36 a 142.48 mg AG/kg y para la miel de Naranja fue de

1142.88 a 363.75 mg AG/kg. Ferreira *et al.* (2009) observaron esta disminución al comparar el contenido de fenoles totales mieles y extractos metanólicos (226-727 mg AG/kg en miel completa y 132-204 mg AG/kg en extractos metanólicos), sin embargo en el caso de la miel de Campanilla la diferencia entre las mieles y los extractos fenólicos fue considerable, los autores señalan que estas diferencias podrían deberse a que la miel está constituida por diversas sustancias que pueden interferir en la reacción de Folin-Ciocalteu, sustancias como el ácido ascórbico, aminoácido, entre otros.

El método de Folin-Ciocalteu se ha empleado ampliamente para la determinación de fenoles totales, los reactivos involucrados en este ensayo, la mezcla del ácido fosfotungstenico y el ácido fosfomolibdenico, pueden reaccionar con compuestos reductores que no son de naturaleza fenólica como los azúcares (Ferreira *et al.*, 2009), por lo que se evaluó un análogo de azúcares que contenía la misma proporción de los azúcares mayoritarios determinados previamente. El valor de fenoles totales para el análogo de azúcares fue de 79.29 mg AG/kg, con lo que observamos una interferencia importante de la matriz alimentaria de la miel, en este ensayo. En el caso de la prolina se obtuvieron valores bajos (3.98 mg AG/kg) en comparación con las mieles analizadas.

Para determinar un potencial mecanismo de acción de los compuestos con actividad antioxidante en la miel se evaluó la actividad antioxidante por medio de cuatro técnicas *in vitro*, dos de ellas en las que el mecanismo de acción está dirigido a la estabilización de radicales libres mediante donación de electrones (Ensayo del ABTS y DPPH), una enfocada a la reducción del Fe^{+3} a Fe^{+2} por donación de electrones (Ensayo FRAP) y una que involucra la quelación de metales de transición como Fe^{+2} (Actividad quelante).

Para el ensayo del ABTS se calculó la concentración inhibitoria media (CI_{50}) y los resultados se reportaron en mg de miel/mL en mieles y en μg de extracto/mL en los extractos metanólicos, en el caso de la prolina y el análogo de azúcares se calcularon los mmol eq. Trolox/kg de miel.

Para determinar la CI_{50} se realizaron curvas de % de inhibición-concentración para las mieles florales (10-500 mg miel/mL) y extractos metanólicos (10-5000 μ g extracto/mL) (Figuras 8 y 9).

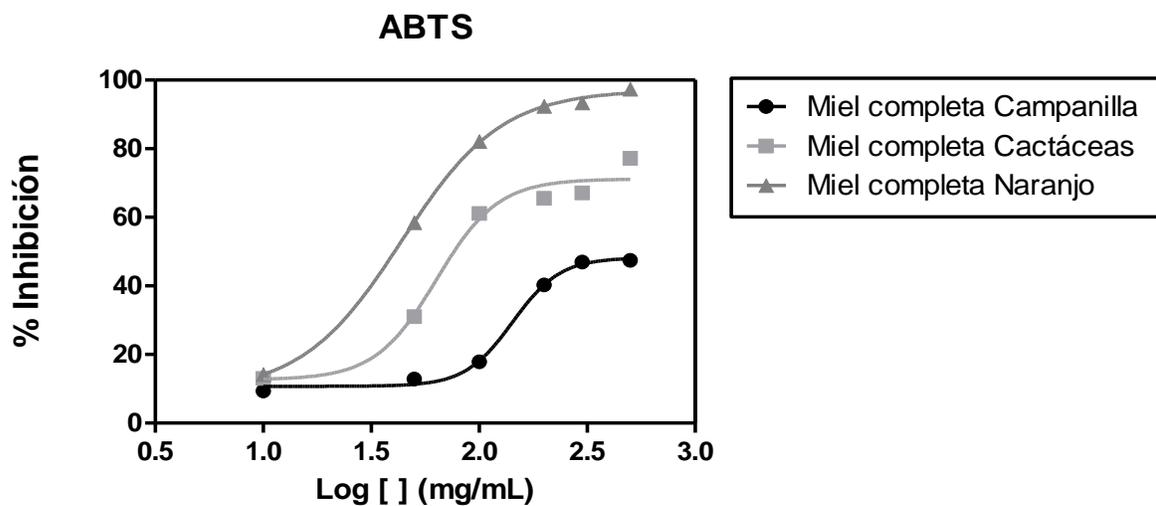


Figura 8. Gráfica de Log [] vs % Inhibición de miel completa utilizando el ensayo de ABTS.

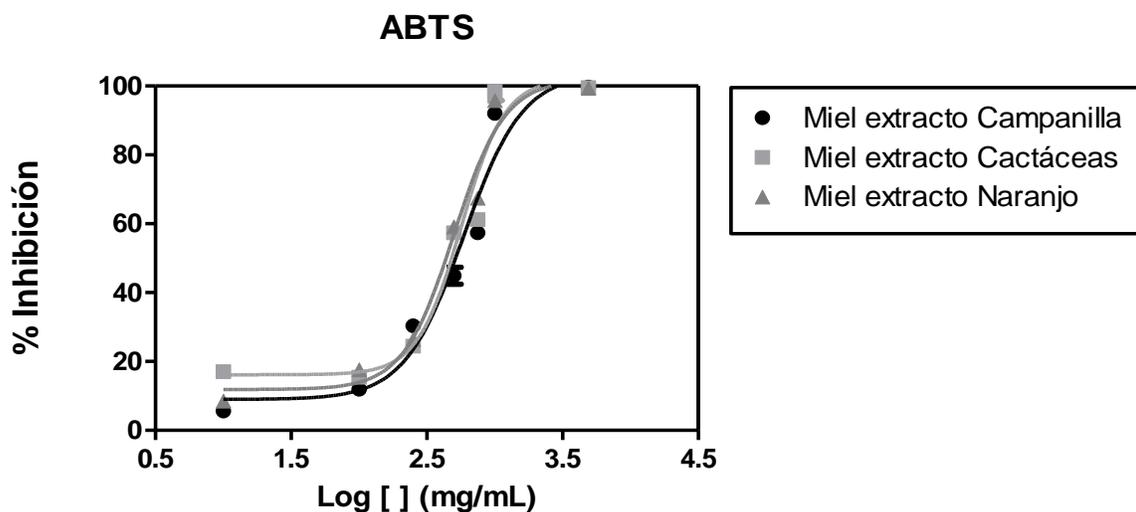


Figura 9. Gráfica de Log [] vs %Inhibición de los extractos metanólicos de las mieles mediante el ensayo de ABTS

Cabe destacar que solo la miel de Naranja presentó inhibición casi total del radical (97 %), la miel de Cactáceas obtuvo un máximo de inhibición del 77 % y la miel de Campanilla del 47 % (Figura 8) a una concentración de 500 mg miel/mL.

En los extractos metanólicos de las mieles florales el valor de CI_{50} fue de 458.07 a 601.60 $\mu\text{g/mL}$ (Cuadro 18). El extracto metanólico de la miel de Naranja presentó los mejores resultados (458.07 $\mu\text{g/mL}$), seguida del extracto de la miel de Campanilla (592.00 $\mu\text{g/mL}$) y de Cactáceas (601.60 $\mu\text{g/mL}$).

Cuadro 18. Ensayo de ABTS para mieles florales y extractos metanólicos de mieles florales.

<i>Muestras</i>	<i>ABTS (Inhibición máxima)^a</i>	<i>ABTS CI_{50}^b</i>	<i>ABTS^c</i>
Análogo de azúcares	-	-	0.08 ± 0.04
Prolina	-	-	0.00 ± 0.00
Campanilla	47.45 ± 1.30	142.96 ± 3.30	0.80 ± 0.01
Cactáceas	77.23 ± 0.70	63.82 ± 1.80	2.50 ± 0.08
Naranja	97.35 ± 0.10	43.76 ± 0.40	3.33 ± 0.06
Campanilla (extracto)	99.74 ± 0.20	592.00 ± 34.70	0.31 ± 0.05
Cactáceas (extracto)	99.74 ± 0.60	601.60 ± 32.70	0.72 ± 0.05
Naranja (extracto)	99.33 ± 0.60	458.07 ± 3.20	1.63 ± 0.11

^a porcentaje (%) a una concentración de 500 mg/mL para mieles completas y de 5000 $\mu\text{g/mL}$ para los extractos metanólicos

^b mg de miel/mL para miel y μg de extracto/mL para los extractos metanólicos

^c mmol Trolox/kg

La actividad inhibitoria del análogo de azúcares y de la prolina para este ensayo fue casi nula, de 0.00 y 0.08 mmol Trolox/kg, respectivamente.

Para el ensayo de DPPH se calculó también la CI_{50} para las mieles evaluadas (mg de miel/mL) y extractos metanólicos (μg de extracto/mL). Para el análogo de azúcares y la prolina se calculó el valor TEAC, los resultados se expresaron en mmol Trolox/kg de miel.

Las curvas de % de inhibición-concentración se muestran en la Figura 9 y 10, para las mieles y los extractos metanólicos respectivamente. Las concentraciones empleadas en las mieles florales fueron desde 10 hasta 600 mg miel/mL y para los extractos metanólicos desde 10 hasta 10000 μg extracto/mL.

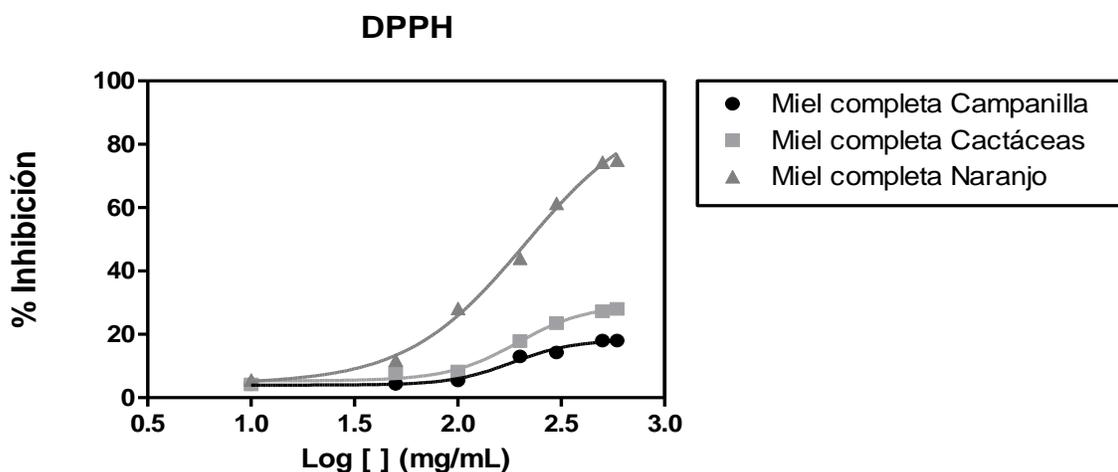


Figura 10. Gráfica de Log [] vs % Inhibición de miel completa utilizando el ensayo de DPPH

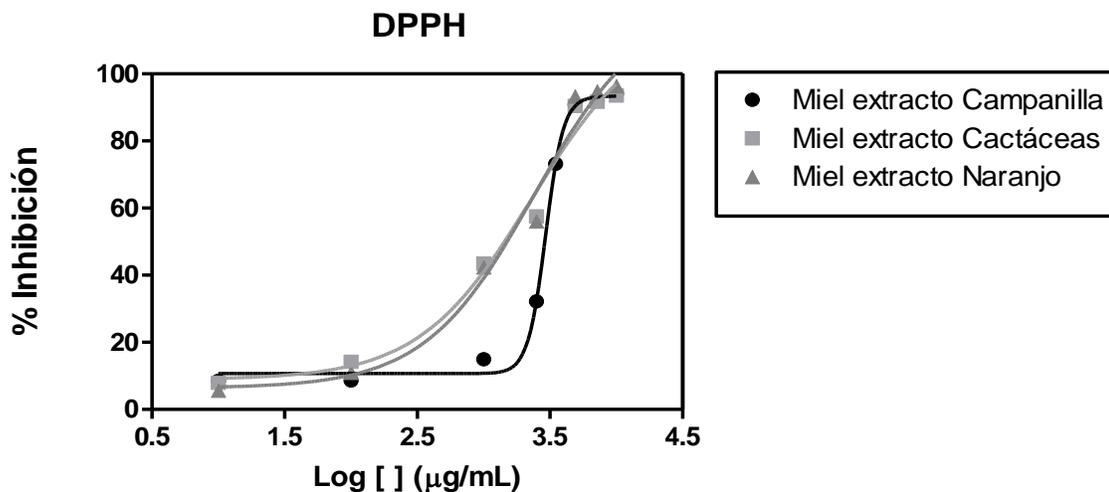


Figura 11. Gráfica de Log [] vs % Inhibición de extractos metanólicos utilizando el ensayo de DPPH

Los resultados se muestran en el Cuadro 19. La CI_{50} fue de 202.93, 193.76 y 184.7 mg/mL, para la miel de Naranja, Cactáceas, y Campanilla respectivamente. Los máximos de inhibición fueron del 74 %, 27 % y 18.37 % para la miel de Naranja, Cactáceas y Campanilla a una concentración de 500 mg miel/mL. Los valores de CI_{50} para las mieles objeto de estudio fueron superiores a los reportados para mieles Portuguesas (106-168 mg/mL) (Ferreira *et al*, 2009). Entre los extractos metanólicos de las mieles evaluadas la CI_{50} fue de 2432 a 2938.33 µg /mL.

En ambos ensayos los extractos metanólicos lograron inhibir el 100 % del radical, en el caso del ensayo de ABTS a la concentración de 5000 µg de extracto/mL y para el ensayo de DPPH con una concentración de 10000 µg de extracto/mL. El análogo de azúcares y la prolina no presentaron actividad contra estos radicales (0.0 y 0.0 mmol Trolox/kg).

Cuadro 19. Ensayo de DPPH para mieles florales, extractos metanólicos, un análogo de azúcares y prolina.

Muestras	DPPH (Inhibición máxima) ^a	DPPH CI_{50} ^b	DPPH ^c
Análogo de azúcares	-	-	0.0 ± 0.00
Prolina	-	-	0.0 ± 0.00
Campanilla	18.37 ± 0.50	184.7 ± 5.30	0.04 ± 0.00
Cactáceas	27.32 ± 0.50	193.76 ± 11.60	0.07 ± 0.01
Naranja	74.36 ± 0.50	202.93 ± 2.90	0.25 ± 0.01
Campanilla (extracto)	94.15 ± 0.90	2938 ± 43.70	0.04 ± 0.00
Cactáceas (extracto)	93.58 ± 0.80	2485 ± 425.30	0.06 ± 0.01
Naranja (extracto)	96.34 ± 0.70	2432 ± 352.20	0.18 ± 0.02

^a porcentaje (%) a una concentración de 600 mg/mL para mieles completas y de 10000 µg/mL para los extractos metanólicos

^bmg de miel/mL para miel y µg de extracto/mL para los extractos metanólicos

^cmmol Trolox/kg

De manera adicional, se determinaron los mmol FeSO₄/kg de miel para el ensayo FRAP en todas las muestras. Los resultados se presentan en el Cuadro 20. La miel de Naranja presentó los mejores resultados (3.10), seguida de la de Campanilla (1.80) y la de Cactáceas (1.17). Los resultados obtenidos para las mieles fueron similares a los reportados para mieles Italianas (1.2-4.4 mmol FeSO₄/kg de miel) (Pichichero *et al.*, 2009).

Al evaluar los extractos metanólicos, nuevamente la miel de Naranja obtuvo los mejores resultados (2.65 mmol FeSO₄/kg), seguida de la miel de Cactáceas (1.11 mmol FeSO₄/kg) y la miel de Campanilla (0.54 mmol FeSO₄/kg). Los resultados son semejantes a los reportados para mieles Italianas (Pichichero *et al.*, 2009).

Cuadro 20. Ensayo FRAP para mieles florales, extractos metanólicos, un análogo de azúcares y prolina.

<i>Muestras</i>	<i>FRAP (mmol FeSO₄/kg miel)</i>
Análogo de azúcares	0.20 ± 0.00
Prolina	0.27 ± 0.10
Campanilla	1.80 ± 0.20
Cactáceas	1.17 ± 0.03
Naranja	3.10 ± 0.10
Campanilla (extracto)	0.54 ± 0.03
Cactáceas (extracto)	1.11 ± 0.10
Naranja (extracto)	2.65 ± 0.10

El análogo de azúcares obtuvo 0.27 mmol FeSO₄/kg miel y la prolina 0.20 mmol FeSO₄/kg de miel.

En el caso de la determinación de la actividad quelante, se calcularon los mmol eq. EDTA/kg de miel. La quelación de metales por los compuestos fenólicos puede prevenir la peroxidación de lípidos provocada por la reacción de Fenton, en la cual se generan radicales libres hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno en presencia de cantidades catalíticas de hierro y cobre (Li *et al.*, 2009). Los resultados se muestran en el Cuadro 21. La miel de Naranja presentó los mejores resultados (0.071 mmol EDTA/kg), seguida de la miel de Cactáceas (0.064 mmol EDTA/kg) y la miel de Campanilla (0.002 mmol EDTA/kg).

Así como la prolina y el análogo de azúcares los extractos metanólicos (5 mg/mL) no presentaron actividad para quelar metales de transición (Fe⁺²).

Cuadro 21. Actividad quelante en mieles florales, extractos metanólicos, un análogo de azúcares y prolina.

<i>Muestras</i>	<i>Actividad quelante (mmol EDTA/kg miel)</i>
Análogo de azúcares	0.00 ± 0.00
Prolina	0.00 ± 0.00
Campanilla	0.00 ± 0.00
Cactáceas	0.06 ± 0.01
Naranja	0.07 ± 0.01
Campanilla (extracto)	0.00 ± 0.00
Cactáceas (extracto)	0.00 ± 0.00
Naranja (extracto)	0.00 ± 0.00

La miel de Naranja y su respectivo extracto metanólico obtuvieron los mejores resultados al evaluar la actividad antioxidante. La responsabilidad del análogo de azúcares y la prolina en lo que respecta a la actividad antioxidante *in vitro* es mínima o nula. Como ya se ha mencionado los azúcares presentan una respuesta al determinar fenoles totales mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu.

Los compuestos presentes en el extracto metanólico son responsables de la actividad antioxidante en las mieles evaluadas. Los extractos metanólicos de la miel de Naranja presentaron los mejores resultados. Los extractos metanólicos de mieles florales (Campanilla, Cactáceas y Naranja) son capaces de donar electrones, lo que estabiliza a los radicales libres que se evaluaron en el ensayo del radical ABTS y DPPH. Sin embargo, no poseen la capacidad de quelar metales.

6.3.2. Determinación del efecto de la digestión *in vitro* sobre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de mieles florales

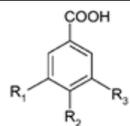
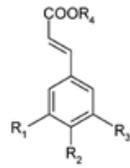
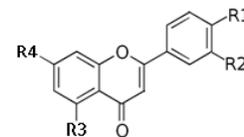
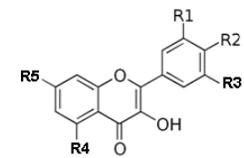
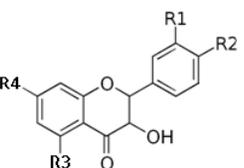
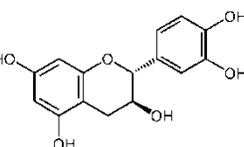
Las mieles en estudio mostraron poseer actividad antioxidante *in vitro*. La miel de Naranja presentó el mayor contenido de fenoles totales y la mayor concentración de catequina, así como la mayor actividad antioxidante en todos los ensayos. Sin embargo, para que los compuestos puedan presentar actividad antioxidante *in vivo* deben de cumplir con dos requerimientos importantes: el primero es ser bioaccesible, lo cual se refiere a la tendencia de los compuestos de ser extraídos de su matriz alimentaria y después ser absorbidos en el intestino delgado. El segundo requerimiento es que su actividad antioxidante persista en plasma, que ésta se mantenga durante el proceso de digestión y que al entrar en las vías metabólicas produzcan derivados todavía activos (Dinnella *et al.*, 2007).

Por lo anterior, se determinó la bioaccesibilidad y la actividad antioxidante de los principales compuestos fenólicos (CF) presentes en las mieles evaluadas, simulando un proceso de digestión *in vitro*.

6.3.2.1. Bioaccesibilidad de los principales compuestos fenólicos en mieles florales y en un análogo de azúcares

Para evaluar la bioaccesibilidad y la actividad antioxidante de los metabolitos secundarios, sin la intervención de compuestos adicionales, se empleó un análogo de azúcares (AA), (fructosa 39.13 g, glucosa 31.42 g, maltosa 6.55, sacarosa 1.62 g y agua 21.29 mL). A esta mezcla de azúcares se incorporaron de forma individual los compuestos fenólicos (CF) mayoritarios identificados en las mieles analizadas. Los CF empleados fueron: ácido gálico, ácido cinámico, quercetina, rutina y catequina, las concentraciones en las que se emplearon fueron las encontradas en las mieles analizadas mediante HPLC (0.05-0.4 mg/g de miel). La representación de las principales familias de ácido fenólicos y flavonoides en las mieles analizadas se muestra en el Cuadro 22.

Cuadro 22. Estructura de los compuestos fenólicos encontrados en las mieles evaluadas

Subclase/compuesto	Estructura química					
Ácidos benzoicos Ácido benzoico Ácido siríngico		R ₁ H OCH ₃	R ₂ H OH	R ₃ H OCH ₃		
Ácidos cinámicos Ácido cinámico Ácido <i>p</i> -cumárico Ácido ferúlico		R ₁ H H OCH ₃	R ₂ H OH OH	R ₃ H H H	R ₄ H H H	
Flavonas Apigenina Luteolina		R ₁ OH OH	R ₂ H OH	R ₃ OH OH	R ₄ OH OH	
Flavonoles Caempferol Quercetina Rutina		R ₁ H OH	R ₂ OH OH	R ₃ H H	R ₄ OH OH	R ₅ OH OH
Flavanonas Narangenina Hesperetina		R ₁ H H	R ₂ OH OCH ₃	R ₃ OH OH	R ₄ OH OH	
Flavanoles Catequina						

Los CF seleccionados se escogieron debido a que representan a las familias de compuestos mayoritarios presentes en las mieles analizadas, (ácidos benzoicos, ácidos cinámicos, flavonas, flavnoles glucosilados y flavanonas).

La bioaccesibilidad de los CF fue evaluada después de un proceso de digestión *in vitro*. La Figura 11 presenta la gráfica del efecto de la digestión *in vitro* sobre el AA con los diferentes compuestos fenólicos evaluados. Además, se estimó un índice de bioaccesibilidad (IB) en base al contenido de CF en la fracción dializada

(D_{Dentro}) comparada con la concentración esperada si el 100 % de los CF hubieran atravesado la membrana de diálisis.

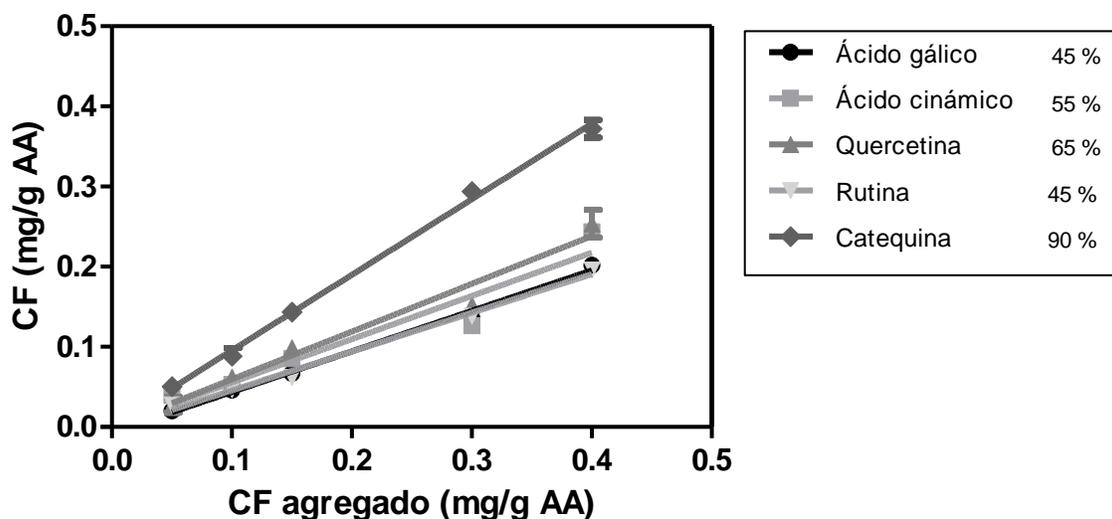


Figure 12. Digestión *in vitro* del AA: CF (Compuesto fenólico), cantidad de CF agregado al AA (CF agregado)

En lo que respecta a la bioaccesibilidad, la concentración de los CF después del proceso de digestión *in vitro* aumentó de manera lineal conforme aumenta la concentración de estos en el AA. En el caso del IB los resultados fueron del 45 al 90 % dependiendo del CF analizado. El ácido gálico y la rutina presentaron un IB del 45 %, el ácido cinámico mostró un 55 %, la quercetina un 65 % y la catequina un 90 %. Indicando que un porcentaje importante de estos pasa a través de la membrana de dializado.

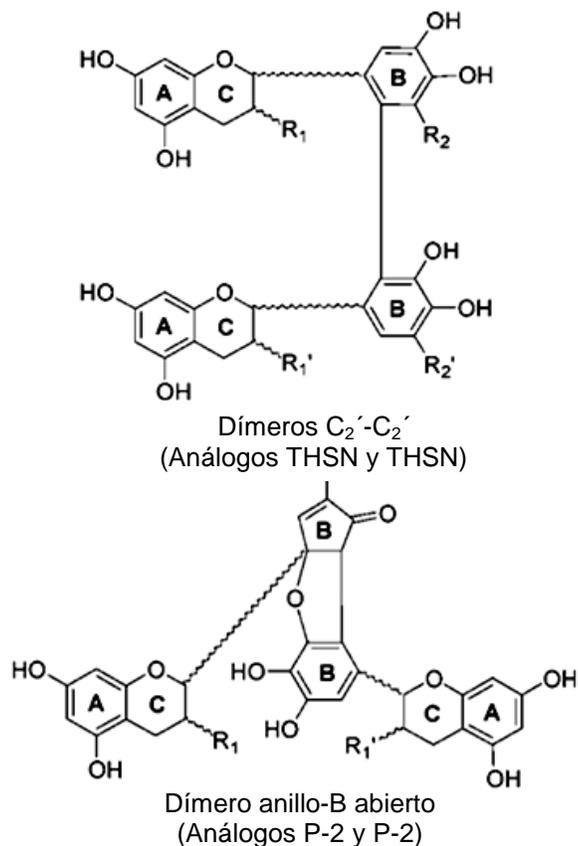
Se han reportado resultados similares para el ácido gálico y cinámico provenientes de pan sometido a diferentes procesos de fermentación (ácido ferúlico 47-62 % y ácido *p*-coumárico 35-47 %) (Hemmerly *et al.*, 2007). Bermúdez-Soto *et al.* (2007) observaron que flavonoles como la quercetina en jugos de aronia se degrada en condiciones de digestión *in vitro*, recuperando después de este proceso porcentajes entre 70-85 %. La rutina, que es el compuesto glucosilado de la

quercetina mostró una menor bioaccesibilidad, esto concuerda con lo reportado por Ortega *et al.* (2009) para compuestos glucosilados en cacao después del proceso de digestión *in vitro*.

Diversos reportes señalan la baja bioaccesibilidad de los CF en diferentes matrices alimenticias, tales como jugo de naranja y granada (Ortega *et al.*, 2009; Gil-Izquierdo *et al.*, 2002). Las diferencias entre el IB de los CF podrían deberse a la solubilidad del compuestos y posiblemente a la alta concentración de azúcar en la muestra, ya que ésta puede limitar la difusión de los CF a través de la membrana de dializado (Ortega *et al.*, 2009).

La estabilidad de la catequina bajo condiciones gastrointestinales se ha estudiado previamente, a pH ácidos (pH gástrico) se muestra estable, sin embargo a pH neutros (pH pancreático) pierde estabilidad, debido a una auto oxidación y a la generación de homo-dímeros como la tiasinensida (Figura 13, Neilson *et al.*, 2007). Sin embargo, en este estudio se recuperó alrededor del 90 % después de ser dializada. Durante el proceso de recuperación la muestra fue acidificada; esto estabiliza la molécula de la catequina en el extracto metanólico provocando una mejor cuantificación. Reportes similares se han observado para catequina procedente de uvas, donde después del proceso de digestión y una posterior acidificación del extracto metanólico, los IB fueron del 92 %.

Gil-Izquierdo *et al.* (2002) observaron IB de 4-30 % para rutina en fresas después de un proceso de dializado sometidas a dos procesos de digestión diferentes. En cambio Boyer *et al.* (2005) reportan para rutina valores de un 90 % y para quercetina de un 50-75 %, procedente de manzana y cebolla, respectivamente. Tagliazucchi *et al.* (2010) indicaron un IB para ácido gálico del 56 % después de la digestión pancreática.



Tipo	Compuesto	R ₁	R ₁ '	R ₂	R ₂ '
Dímero	4, 5	Galato	Galato	OH	OH
	8, 9	OH	OH	OH	OH
	14, 15	Galato	OH	OH	OH
	18, 19	Galato	Galato	OH	H
Dímero anillo-B abierto	6	Galato	Galato	-	-
	10-12	OH	OH	-	-
	16, 17	Galato/OH	OH/galato	-	-

Figura13. Estructuras propuestas de la oxidación de los dímeros de homo- y heterocatequina (Extraída de Neisol *et al.*, 2007)

La bioaccesibilidad de los CF presentes en alimentos, depende de diversos factores, tales como la matriz del alimento, la estructura química, hidrofobicidad y forma nativa de las moléculas con actividad biológica (Tagliazucchi *et al.*, 2010).

6.3.2.2. Bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos en mieles florales

Los resultados correspondientes al proceso de digestión *in vitro* de las mieles en estudio se muestran en la Figura 14.

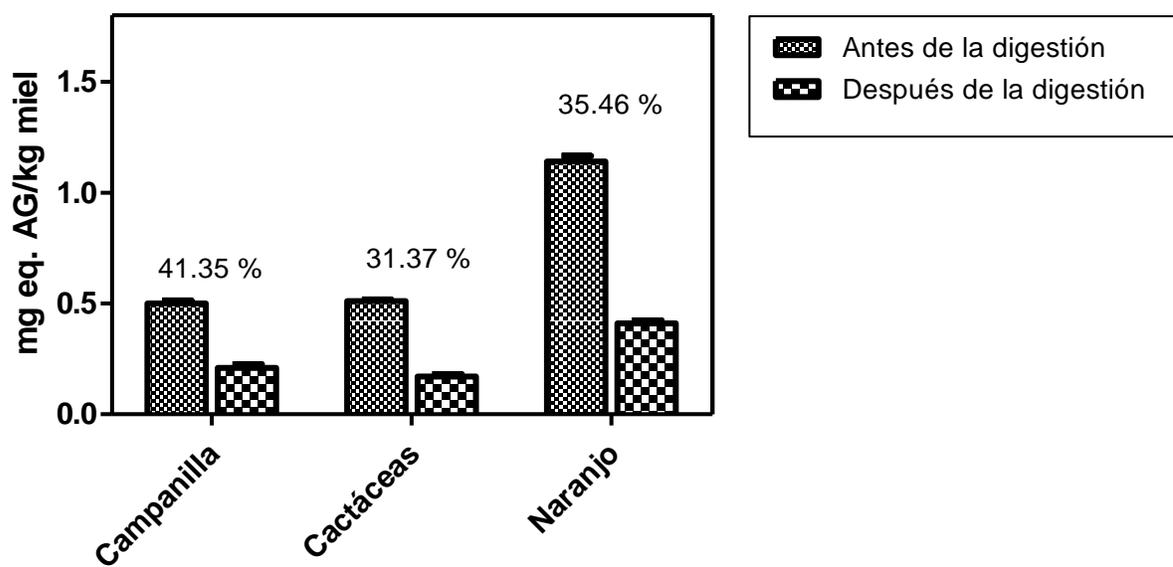


Figure 14. Digestión *in vitro* de las mieles analizadas (% = porcentaje de bioaccesibilidad)

El contenido de fenoles totales se calculó usando un modelo dosis-dependiente en ausencia de limitantes de la difusión, el cual consiste en poner en contacto a la muestra después de la digestión gástrica y pancreática con una membrana de diálisis.

Al inicio de sección se discutió el contenido de compuestos fenólicos de las mieles analizadas: la miel de Naranja tuvo los mayores valores, (1142.88 mg eq. AG/kg), seguida de la miel de Cactáceas (506.36 mg eq. AG/kg), y la miel de flor de Campanilla (495.67 mg eq. AG/kg). Después del proceso de digestión el contenido de fenoles totales calculado en la fracción dializada (D_{Dentro}) disminuyó.

La miel de Naranja obtuvo los mayores resultados (410.00 mg AG/kg), seguida de la miel de Campanilla (210 mg AG/kg), y la miel de flor de Cactáceas (170 mg AG/kg). Los resultados para el IB fueron de 31.87 a 41.68 %. La miel de Campanilla obtuvo los mayores resultados (41.35 %), seguida de la miel de Naranja (35.46 %), y la miel de Cactáceas (31.37 %). Se observaron diferencias entre cada muestra antes y después del proceso de dializado. Los resultados indican una baja bioaccesibilidad de los CF empleando el proceso de digestión *in vitro* descrito en esta investigación. Esto se ha observado previamente para CF en jugo de aronia (Neilson *et al.*, 2007).

Existe evidencia de que los CF pueden presentar cambios estructurales durante el proceso de digestión *in vitro*, los cuales podrían reducir la fracción bioaccesible. Además, de que las interacciones entre los compuestos de la sal pancreatina-bilis y los CF pueden generar complejos insolubles (McDougall *et al.*, 2005). Adicionalmente, se ha observado la formación de polímeros de catecol oxidado en soluciones alcalinas similares a la solución pancreática usada en este tipo de proceso *in vitro* (Neilson *et al.*, 2007). Bermúdez-Soto *et al.* (2007) indicaron que los bajos IB de los CF pueden atribuirse al proceso de dializado. Este es un proceso complejo que se ve afectado por diversos factores, tales como, el volumen y la composición de la solución amortiguadora, la concentración de azúcares en la muestra y la habilidad de ciertas moléculas para bloquear los poros de la membrana de dializado.

La variabilidad en el IB entre muestras se ha reportado previamente, Dinnella *et al.* (2007), reportaron valores de IB de 39 hasta 90 % para CF provenientes de aceites de oliva. Sin duda alguna, el perfil de CF puede tener implicaciones importantes para la bioaccesibilidad.

6.3.2.3. Efecto de la digestión *in vitro* sobre la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos de mieles florales

Los CF son los principales compuestos con actividad antioxidante en la miel, por lo que se determinó la actividad antioxidante después del proceso de digestión *in vitro* en la fracción dializada (D_{Dentro}). Los resultados se reportan como mg Trolox/g de miel para el AA con diferentes CF empleando el ensayo del radical ABTS y se muestran en la Figura 15. La actividad antioxidante de los CF en el AA presentó una relación con la concentración, lo que sugiere que la actividad antioxidante del CF después de cruzar la membrana no se ve mermada por el proceso de digestión *in vitro*.

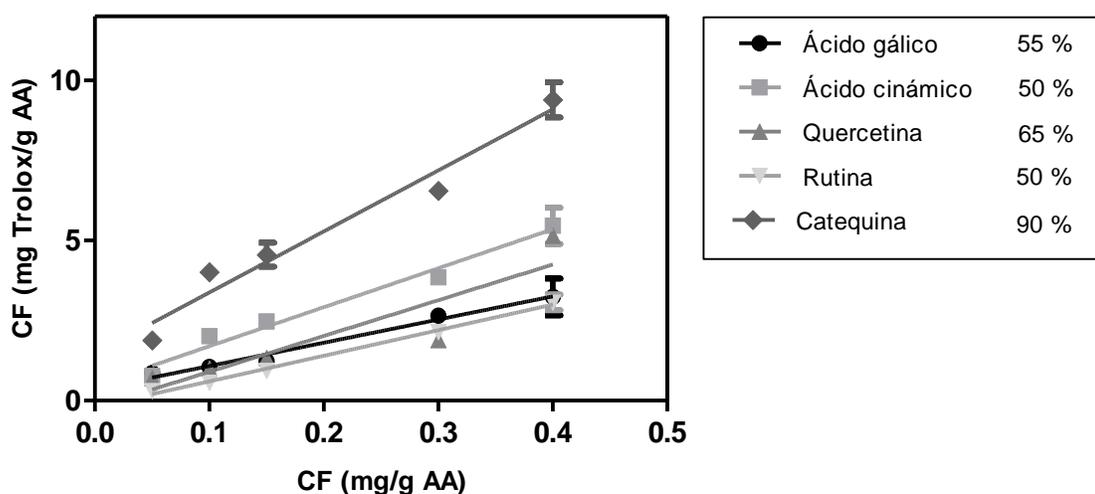


Figure 15. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos en el AA después del proceso de digestión *in vitro*.

Las propiedades de ionización de los CF intervienen en gran medida en la actividad antioxidante. En el Cuadro 23 se presenta el logaritmo de la constante de disociación (pK) para los principales compuestos fenólicos presentes en las mieles evaluadas, este parámetro nos indica el valor de pH donde el 50 % de las moléculas del ácido están ionizadas.

Cuadro 23. Valores de pK para compuestos fenólicos presentes en las mieles en estudio

<i>Compuestos</i>	pK_1	pK_2	pK_3	pK_4
Ácido benzoico	4.20			
Ácido gálico	4.24	8.67		
Ácido <i>p</i> -cumárico	4.39	8.37		
Ácido cinámico	4.44			
Ácido ferúlico	4.56	8.65		
Hesperitina	6.67	8.76	11.54	
Caempferol	8.20	9.50		
Quercetina	6.74	9.02	11.55	
Rutina	7.10	9.15	11.65	
Catequina	8.64	9.41	11.26	13.26

Jovanovic *et al.*, 1994; Ozkorucuklu *et al.*, 2009.

Como podemos observar durante la diálisis (pH 7) los ácidos fenólicos (ácido gálico y cinámico) evaluados en el AA se encuentran deprotonados, en el caso de los flavonoides (quercetina, rutina y catequina) solo la catequina se encuentra protonada.

Por lo que, para el ácido gálico, cinámico, la quercetina y la rutina sería más sencillo donar sus electrones en comparación con la catequina. Sin embargo, debido a que la actividad antioxidante tiene una relación con la concentración, podemos observar que esta influye en el resultado final, al migrar a través de la membrana en mayor cantidad la catequina fue la que presentó una mayor actividad.

Antes del proceso de digestión, la miel de Naranja obtuvo la mayor actividad antioxidante (0.83 mg Trolox/g), seguida de la miel de Cactáceas (0.62 mg Trolox/kg), y Campanilla (0.20 mg Trolox/kg). Al llevar a cabo el proceso de digestión la actividad antioxidante disminuyó (Cuadro 24). La miel de Naranja tuvo una

actividad antioxidante de 0.42 mg eq. Trolox/g, seguida de la miel de Cactáceas con 0.37 mg eq. Trolox/g, y por último la miel de Campanilla con 0.13 mg eq. Trolox/g.

Cuadro 25. Valores de actividad antioxidante determinados antes y después del proceso de digestión *in vitro*

Miel	mg Trolox/g miel	mg Trolox D_{Dentro} /g miel	Actividad antioxidante remanente (%)
Campanilla	0.20 ± 0.00	0.13 ± 0.01	65.09 ± 4.15
Cactáceas	0.62 ± 0.02	0.37 ± 0.01	58.29 ± 2.15
Naranja	0.83 ± 0.02	0.42 ± 0.04	56.68 ± 2.99

Actividad antioxidante para 1 g de miel en mg Trolox antes de la digestión *in vitro* (mg eq. Trolox/g miel), después de la digestión (mg eq. Trolox D_{Dentro} /g miel), y la comparación entre la actividad antioxidante antes y después de la digestión *in vitro* (Actividad antioxidante remanente, %).

La disminución de la actividad antioxidante después del proceso de digestión *in vitro* se ha observado en estudios previos, Dinnella *et al.* (2007) observaron que el proceso de digestión tiene un efecto negativo en la actividad antioxidante de aceite de oliva.

De manera adicional, se comparó la actividad antioxidante antes y después de la digestión, la actividad antioxidante antes de la digestión se tomó como el 100 % y se calculó la actividad antioxidante remanente. La miel de Campanilla obtuvo los mejores resultados (65.09 %), seguida de la miel de Cactáceas (58.29 %), y la miel de Naranja (56.68 %). Podemos observar que la actividad de los compuestos fenólicos presentes en la miel disminuyó después de un proceso de digestión. La actividad antioxidante remanente nos indica que aunque inicialmente una muestra determinada presente mayor potencial antioxidante, después del proceso de digestión esta tendencia puede cambiar. Lo anterior debido a que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos está influenciada en gran medida por su estructura química, interacciones entre compuestos y/o efectos sinérgicos (Fukumoto y Mazza, 2000).

6.3.2.4. Relación entre el perfil de compuestos fenólicos y el proceso de digestión *in vitro*

Los resultados de la determinación del perfil de los compuestos fenólicos (CF) en las mieles de estudio, antes y después del proceso de digestión *in vitro* se muestran en el Cuadro 25.

El perfil de metabolitos secundarios se determinó mediante HPLC de acuerdo a lo descrito en la sección 5.2.2. En las muestras se identificaron cinco ácidos fenólicos antes y después del proceso de digestión (ácido gálico, cinámico, siríngico, *p*-coumárico y ferúlico) y ocho flavonoides (apigenina, luteolina, caempferol, quercetina, rutina, naringenina, hesperetina y catequina). La miel de Campanilla presentó un mayor número de compuestos identificados, 13 de 14, seguida de la miel de Cactáceas, 12 de 14, y por último la miel de Naranja, 9 de 14 compuestos posibles. Los compuestos que se cuantificaron como mayoritarios fueron la catequina, rutina, quercetina, apigenina, ácido benzoico, ácido siríngico y ácido ferúlico.

Después del proceso de digestión *in vitro* (digestión gástrica y duodenal, y proceso de dializado), la concentración de los CF disminuyó y en algunos casos no fue posible identificarlos y cuantificarlos. Para la miel de Campanilla, los 13 CF identificados antes del proceso de digestión logran encontrarse después de éste, solo que en menores concentraciones. En el caso de la miel de Cactáceas y la miel de Naranja, además de que los CF se encontraron en menores concentraciones, la catequina y el ácido benzoico no fueron identificados, respectivamente.

Durante el proceso de digestión, algunos flavonoides pueden convertirse en chalconas, a pH neutros algunos compuestos pueden interactuar con la mezcla bilis-pancreatina formando complejos, lo anterior puede limitar la solubilidad de los CF, además de impedir la migración de estos a través de la membrana de diálisis, reduciendo su cuantificación después del proceso de digestión *in vitro* (Gil-Izquierdo *et al.*, 2002).

Cuadro 25. Perfil de compuestos fenólicos en mieles florales antes y después de un proceso de digestión *in vitro* ($\mu\text{g}/100 \text{ g miel}$)

Compuestos fenólicos	Campanilla		Cactáceas		Naranja	
	AD	DD	AD	DD	AD	DD
Ácido siríngico	7.94 \pm 0.9	2.18 \pm 0.0	7.96 \pm 0.3	2.08 \pm 0.1	7.90 \pm 0.8	2.31 \pm 0.1
Ácido ferúlico	3.09 \pm 0.7	0.71 \pm 0.2	16.98 \pm 2.0	0.62 \pm 0.1	1.31 \pm 0.1	0.55 \pm 0.1
Ácido benzoico	20.29 \pm 2.6	7.82 \pm 0.2	25.97 \pm 0.7	5.84 \pm 0.1	9.17 \pm 1.6	ND
Ácido cinámico	0.01 \pm 0.0	0.01 \pm 0.0	0.21 \pm 0.0	0.05 \pm 0.0	0.02 \pm 0.0	0.02 \pm 0.0
Ácido <i>p</i> -coumárico	18.43 \pm 0.6	9.56 \pm 0.9	ND	ND	ND	ND
Catequina	415.72 \pm 27.7	397.02 \pm 10.8	301.37 \pm 70.9	ND	479.53 \pm 47.5	156.10 \pm 10.0
Rutina	125.1 \pm 19.0	21.95 \pm 4.1	79.04 \pm 13.1	35.93 \pm 1.3	78.77 \pm 1.8	32.8 \pm 4.5
Luteolina	2.42 \pm 0.2	0.72 \pm 0.2	9.79 \pm 1.4	ND	ND	ND
Quercetina	15.99 \pm 1.7	10.74 \pm 1.4	48.78 \pm 13.0	23.92 \pm 0.2	30.04 \pm 2.0	3.02 \pm 0.2
Apigenina	36.51 \pm 6.5	12.2 \pm 0.8	32.77 \pm 2.3	28.31 \pm 2.9	ND	ND
Narangenina	0.58 \pm 0.0	0.02 \pm 0.0	0.35 \pm 0.1	0.02 \pm 0.0	1.07 \pm .01	0.01 \pm 0.0
Caempferol	2.10 \pm 0.3	1.54 \pm 0.0	4.13 \pm 0.0	2.48 \pm 0.0	5.09 \pm 0.2	3.77 \pm 0.0
Hesperetina	0.05 \pm 0.0	0.01 \pm 0.0	0.16 \pm 0.0	0.02 \pm 0.0	ND	ND

AD = Antes de la digestión

DD = Después de la digestión

ND = No detectados

6.4. Compuestos con actividad antimicrobiana en mieles florales: Campanilla, Cactáceas y Naranja

Existe evidencia que señala que la miel posee propiedades antimicrobianas y que estas son resultado de las altas concentraciones de azúcares, el peróxido de hidrógeno que se produce por medio de la enzima glucosa oxidasa y de compuestos no peróxidos como los compuestos fenólicos.

En la sección 6.1 se identificaron mieles mexicanas con potencial biológico, como se mencionó anteriormente se eligieron mieles con actividad antioxidante y antimicrobiana destacadas. De las mieles seleccionadas, la miel de Campanilla presentó las mejores propiedades antimicrobianas inhibiendo el crecimiento de actividad antimicrobiana contra 4 microorganismos patógenos en alimentos (*B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *S. Typhimurium*). Sin embargo, no se identificaron los compuestos responsables de tal actividad, por lo que en esta sección se llevó a cabo dicha identificación en las tres mieles de estudio.

Nuevamente se empleó la curva de crecimiento microbiano y se calcularon los valores de velocidad de crecimiento (μ , DO/h), duración de la fase lag (h) y densidad de la máxima población (DMP, DO) (como se describe en la sección 6.1.3.).

Se llevó a cabo una prueba de Dunnet para observar diferencias significativas entre la duración de la fase lag de cada uno de los tratamientos. El control empleado fue este parámetro de cada uno de los seis microorganismos tratados respectivamente. Se utilizó ésta como parámetro comparativo debido a su aumento tiene un impacto relevante en la conservación de alimentos.

6.4.1. Miel

La miel de Campanilla y Manuka inhibieron el crecimiento de los 6 microorganismos analizados (*B. cereus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*). La miel de Cactáceas y Naranja tuvieron efecto

Cuadro 26. Actividad antimicrobiana de mieles florales sobre microorganismos Gram positivos

Muestras		Gram positivos								
		<i>Bacillus cereus</i>			<i>Listeria monocytogenes</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
		μ (DO/h)	lag (h)	DMP (DO)	μ (DO/h)	lag (h)	DMP (DO)	μ (DO/h)	lag (h)	DMP (DO)
Miel	1	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a
	2	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0.05 ± 0.01	19.71 ± 4.86*	0.47 ± 0.06	0.06 ± 0.01	17.41 ± 0.85*	0.32 ± 0.05
	3	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0.04 ± 0.00	17.76 ± 0.93*	0.37 ± 0.02	0.05 ± 0.01	13.22 ± 0.73*	0.57 ± 0.04
	4	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a
Extractos	1	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a
	2	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a
	3	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a
	4	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0.09 ± 0.01	6.04 ± 0.18*	0.90 ± 0.00
Catalasa	1	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a
	2	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a	0.11 ± 0.01	6.94 ± 0.07*	0.56 ± 0.04	0.10 ± 0.01	7.07 ± 0.24*	0.53 ± 0.01
	3	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a	0.07 ± 0.00	19.91 ± 0.02*	0.25 ± 0.01	0.10 ± 0.02	7.47 ± 0.82*	0.57 ± 0.13
	4	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a	0.11 ± 0.01	7.08 ± 0.34*	0.52 ± 0.05
H ₂ O ₂	A	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a	0.10 ± 0.00	5.63 ± 0.13	0.93 ± 0.10
	B	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0.27 ± 0.00	5.54 ± 0.00	0.55 ± 0.01	0.09 ± 0.01	5.93 ± 0.16	0.86 ± 0.01
	C	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0.14 ± 0.00	4.36 ± 0.00	0.66 ± 0.01	0.10 ± 0.00	6.27 ± 0.11	0.84 ± 0.01
AA		0.09 ± 0.02	8.52 ± 0.75	0.56 ± 0.12	0.08 ± 0.01	5.29 ± 0.30	0.37 ± 0.03	0.08 ± 0.01	5.73 ± 0.54	0.34 ± 0.03
CST		0.09 ± 0.02	5.54 ± 0.86	0.93 ± 0.02	0.08 ± 0.02	4.48 ± 0.42	0.41 ± 0.00	0.08 ± 0.00	5.50 ± 0.18	0.99 ± 0.00

Los resultados son la media de 3 experimentos independientes ± DE. * Efecto significativo en el aumento de la duración de la fase lag. DO = densidad óptica, DMP = densidad de máxima población, ^a no desarrolló, 1 = miel de Campanilla, 2 = miel de Cactáceas, 3 = miel de Naranja, 4 = miel de Manuka, A = 1165 ppm, B = 650 ppm, C = 200 ppm y AA = análogo de azúcares.

Cuadro 27. Actividad antimicrobiana de mieles florales sobre microorganismos Gram negativos

Muestras		Gram negativos								
		<i>Salmonella Typhimurium</i>			<i>Eschechrichia coli</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
		μ (OD/h)	lag (h)	DMP (OD)	μ (OD/h)	lag (h)	DMP (OD)	μ (OD/h)	lag (h)	DMP (OD)
Miel	1	0 ^a	> 48 ^{a*}	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a
	2	0.06 ± 0.03	5.71 ± 2.0*3	0.57 ± 0.05	0.13 ± 0.04	6.94 ± 0.68	0.44 ± 0.01	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a
	3	0.10 ± 0.04	6.81 ± 0.5*4	0.45 ± 0.01	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a	0.20 ± 0.01	10.20 ± 0.44*	0.65 ± 0.02
	4	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a
Extractos	1	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a
	2	0 ^a	> 48 ^a	0.0 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a
	3	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a
	4	0.07 ± 0.01	4.05 ± 0.67	0.90 ± 0.02	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a
Catalasa	1	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a
	2	0.09 ± 0.00	5.99 ± 0.18*	0.55 ± 0.01	0.16 ± 0.02	6.21 ± 0.12	0.54 ± 0.04	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a
	3	0.10 ± 0.00	6.31 ± 0.03*	0.48 ± 0.01	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a
	4	0 ^a	> 48 ^a	0.2 ^a	0.15 ± 0.05	6.42 ± 0.52	0.48 ± 0.09	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a
H ₂ O ₂	1	0.10 ± 0.00	3.58 ± 0.42	0.90 ± 0.01	0.06 ± 0.00	4.12 ± 0.17	0.75 ± 0.02	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a
	2	0.07 ± 0.00	4.25 ± 0.13	0.88 ± 0.00	0.13 ± 0.07	6.46 ± 0.46	0.69 ± 0.04	0 ^a	> 48 ^a	0.1 ^a
	3	0.06 ± 0.01	4.64 ± 0.48	0.85 ± 0.01	0.19 ± 0.06	7.80 ± 0.48	0.55 ± 0.05	0.03 ± 0.01	17.78 ± 0.62*	0.33 ± 0.08
AA		0.10 ± 0.01	7.72 ± 0.04	0.48 ± 0.02	0.16 ± 0.05	8.25 ± 0.54	0.43 ± 0.11	0.35 ± 0.01	9.30 ± 0.34	0.35 ± 0.05
CST		0.07 ± 0.01	4.95 ± 0.56	1.04 ± 0.03	0.15 ± 0.06	7.18 ± 0.61	0.59 ± 0.07	0.27 ± 0.03	8.29 ± 0.53	0.50 ± 0.08

Los resultados son la media de 3 experimentos independientes ± DE.

DO = densidad óptica, DMP = densidad de máxima población, ^a no desarrolló, 1 = miel de Campanilla, 2 = miel de Cactáceas, 3 = miel de Naranja, 4 = miel de Manuka, A = 1165 ppm, B = 650 ppm, C = 200 ppm y AA =análogo de azúcares.

sobre al menos uno de los parámetros de crecimiento: incremento en la duración de la fase lag o disminución de la velocidad de crecimiento y la DPM (Cuadro 26 y 27).

La sensibilidad de los microorganismos a la actividad antibacteriana de la miel siguió el orden que a continuación se señala: *B. cereus* > *P. aeruginosa* = *E. coli* > *S. aureus* > *L. monocytogenes* > *S. Typhimurium*.

La miel de Naranja no presentó efecto inhibitorio contra *P. aeruginosa*. En el caso de *E. coli* la miel de Cactáceas no produjo dicho efecto. Al evaluar a *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*, ambas mieles Cactáceas y Naranja no presentaron efecto inhibitorio. Sin embargo, se observó que el empleo de las mieles analizadas aumentó la duración de la fase lag significativamente. Las cuatro mieles aumentaron la fase lag de *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. No se observó un aumento significativo de la fase lag en *E. coli* cuando se trató con la miel de Cactáceas y en *S. Typhimurium* con la miel de Cactáceas y Naranja.

Resultados de la actividad antimicrobiana de mieles de diversos países, (mieles Neozelandesas, Costarricenses, Checas, Canadienses, Sudafricanas, Portuguesas, Nigerianas, Cubanas y Turcas) contra microorganismos patógenos se ha reportado previamente (Frech *et al.*, 2005; Estrada *et al.*, 2005; Vorloa *et al.*, 2005; Brudzynski, 2006; Basson y Grobler, 2008; Estevihno *et al.*, 2008; Omafuvbe y Akanbi, 2009, Alvarez-Saurez *et al.*, 2010; Silici *et al.*, 2010). Empleándose concentraciones similares y mayores, además de llevarse a cabo bajo condiciones experimentales diferentes.

6.4.2. Extractos metanólicos de mieles florales

Los extractos evaluados de la miel de Campanilla, Cactáceas y Naranja presentaron efecto inhibitorio contra los seis microorganismos evaluados. Sólo el extracto metanólico de la miel de Manuka no inhibió el crecimiento de *S. aureus* y *S. Typhimurium* (Cuadro 26 y 27). Sin embargo, en el caso de *S. Typhimurium* aumentó la duración de la fase lag de manera significativa.

La sensibilidad de los microorganismos a la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de las mieles evaluadas siguió el orden que a continuación se señala: *B. cereus* = *L. monocytogenes* = *E. coli* = *P. aeruginosa* > *S. aureus* > *S. Typhimurium*.

Estevihno *et al.* (2008) evaluaron el efecto inhibitorio de extractos de compuestos fenólicos de miel clara y oscura del nordeste de Portugal sobre *B. subtilis* CECT 498, *S. aureus* ESA 40, *E. coli* ESA 31, *P. aeruginosa* ESA 25, *K. pneumonia* ESA 8 y *S. lentus* ESA 10 observando que los extractos de compuestos fenólicos tuvieron actividad antimicrobiana inhibitoria similares sobre todos los microorganismos con excepción de *P. aeruginosa*. Esta inhibición dependió en gran medida de la sensibilidad a estos compuestos mostrada por los microorganismos evaluados. En nuestro estudio, la sensibilidad de los microorganismos evaluados fue diferente, ya que para *P. aeruginosa* el efecto inhibitorio se observó claramente.

Como ya se mencionó en secciones previas, la actividad antimicrobiana de la miel depende de la presencia de ácidos orgánicos, el peróxido de hidrógeno y compuestos no-peróxidos como los compuestos fenólicos. Los ácidos orgánicos, pueden ejercer una actividad antimicrobiana al cruzar la membrana de los microorganismos en estado disociado, lo que genera un aumento de pH en el interior de la célula y un desequilibrio en el gradiente del pH. Este desequilibrio genera una acumulación de aniones y protones dentro de la célula, lo que provoca disrupción de la membrana, inhibición de reacciones metabólicas esenciales, estrés de la homeostasis en el pH intracelular. Debido a la hidrofobicidad de los compuestos fenólicos, estos pueden generar perturbaciones o incluso ruptura de la membrana, sin embargo debido a que se encuentran en concentraciones bajas generalmente solo causan la inhibición del crecimiento bacteriano y no la muerte (Brul y Coote, 1999). El peróxido de hidrógeno actúa generando radicales libres, lo que origina un daño en las proteínas celulares, lípidos y ácidos nucleicos (Yousef y Juneja, 2003).

Al evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos del extracto metanólico de miel se observó un efecto claro sobre la inhibición del crecimiento de los microorganismos evaluados, sin embargo el extracto metanólico de la miel de

Manuka no fue capaz de inhibir el crecimiento de dos microorganismos (*S. aureus* y *S. Typhimurium*), lo que hace suponer que el perfil de compuestos fenólicos interfiere en la actividad antioxidante de los extractos evaluados.

6.4.3. Catalasa con miel

Al colocar catalasa en las mieles analizadas su actividad antimicrobiana sobre los microorganismos se vió disminuida. La miel de Campanilla inhibió el crecimiento de los seis microorganismos analizados. La miel de Cactáceas, Naranja y Manuka tuvieron efecto sobre al menos uno de los parámetros de crecimiento: incremento en la duración de la fase lag o disminución de la μ y la DMP (Cuadro 26 y 27).

La sensibilidad de los microorganismos a la actividad antibacteriana de la miel con catalasa siguió el orden que a continuación se señala: *B. cereus* = *P. aeruginosa* > *L. monocytogenes* > *S. Typhimurium*. > *E. coli* > *S. aureus*.

La miel de Cactáceas-catalasa no inhibió el desarrollo de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* y *E. coli*. Sin embargo, aumentó la duración de la fase lag de los primeros tres microorganismos significativamente. Para la miel de Naranja-catalasa los resultados obtenidos muestran que no presentó un efecto inhibitorio sobre *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *S. Typhimurium*. Aunque se observó nuevamente un efecto significativo en el aumento de la fase lag. Por último, la miel de Manuka-catalasa no mostró inhibición sobre el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*. Presentando un efecto significativo en el aumento de la fase lag de *S. aureus*. Los valores de la duración de la fase lag, la velocidad de crecimiento y la DMP se muestran en los Cuadros 27 y 28.

Las propiedades antimicrobianas en miel se han visto fuertemente relacionado con la concentración de peróxido (Weston, 2000), por lo que al aplicar catalasa anteriormente inhibir la producción de peróxido, el efecto inhibitorio se redujo. Esto se ha observado previamente, Taomari *et al.*, 2001 observaron este mismo efecto al adicionar catalasa a mieles florales diluidas al 25 %, (p/v) evaluadas contra *L.*

monocytogenes y *S. aureus*. Sin embargo, la miel de Campanilla conservó el efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano de todos los microorganismos evaluados. Con lo que podemos señalar que los compuestos no-peróxidos de esta miel le confieren la actividad antimicrobiana mostrada.

6.4.4. Peróxido de hidrógeno

El efecto del peróxido de hidrógeno sobre los microorganismos patógenos se evaluó a tres concentraciones (1165, 650 y 200 ppm). La sensibilidad de los microorganismos al peróxido de hidrogeno mostró el siguiente orden: *B. cereus* > *P. aeruginosa* > *L. monocytogenes* > *S. aureus* = *S. Typhimurium* = *E. coli* (Cuadro 26 y 27).

Las tres concentraciones evaluadas inhibieron el crecimiento de *B. cereus*. La concentración de 200 ppm afectó el desarrollo de *P. aeruginosa* presentando un efecto significativo en el aumento de la duración de la fase lag (aumentó de 8.29 a 17.78 h). Para *L. monocytogenes* la concentración de 200 y 650 ppm no presentó un efecto inhibitorio. *S. aureus*, *S. Typhimurium* y *E. coli* no se vieron afectadas por ninguna de las concentraciones evaluadas.

La inhibición de desarrollo que genera el peróxido de hidrógeno puede depender de la concentración y de su acumulación durante el tiempo de exposición a las mieles evaluadas. Diversos factores pueden afectar la acumulación de peróxido de hidrógeno: la inactivación de la enzima glucosa oxidasa por calor o luz, la degradación del peróxido de hidrógeno por la catalasa originaria del néctar, y el secuestro químico (Kwakman *et al*, 2011). Corroborando los resultados obtenidos al someter las mieles a tratamientos con catalasa, ya que en algunos casos disminuyó o eliminó la actividad antimicrobiana de las mieles analizadas.

Los resultados señalan que la sensibilidad de los microorganismos expuestos a peróxido de hidrógeno puede jugar un papel importante en el efecto que éste tenga sobre ellos.

6.4.5. Análogo de azúcares

La concentración que se empleó del análogo de azúcares (10 %, p/v) no impidió el desarrollo de los microorganismos. Sin embargo, si afectó su comportamiento al aumentar ligeramente la duración de la fase lag (1-2 h) y disminuir la velocidad máxima de crecimiento y la DPM. Estos resultados concuerdan con los reportados por Kwakman *et al.* (2011) para *B. subtilis*, *E. coli* y *P. aeruginosa* en contacto con miel al 10 %.

Debido a que todos los tratamientos aplicados sobre *B. cereus* inhibieron el crecimiento de este patógeno esporulado, esto puede sugerir el empleo de las mieles analizadas como conservador en alimentos listos para su consumo. Por último, los resultados nos indican que los principales compuestos que están involucrados en la actividad antimicrobiana en las mieles analizadas son el peróxido de hidrógeno y los compuestos fenólicos, y en algunos casos sus interacciones, además de la resistencia innata que posee el microorganismos hacia el estrés que generan estos compuestos.

7. CONCLUSIONES

Se encontró una gran variabilidad al evaluar los parámetros de calidad y las propiedades antioxidante y antimicrobiana de 14 mieles Mexicanas. Éstas demostraron ser una fuente importante de metabolitos secundarios con propiedades biológicas relacionadas con la salud humana. La miel M6 (Campanilla), M7 (Cactáceas) y M8 (Naranja) fueron elegidas en base a su color y propiedades antioxidante y antimicrobiana para estudios posteriores.

La catequina, rutina, quercetina, ácido siríngico, ácido ferúlico y ácido benzoico fueron los compuestos fenólicos mayoritarios encontrados en las mieles florales: Campanilla, Cactáceas y Naranja. Tanto el contenido de prolina como el perfil de azúcares mayoritarios demostraron que las mieles (Campanilla, Cactáceas y Naranja) evaluadas son de procedencia floral y no fueron adulteradas en estadios previos a este trabajo. La miel al ser diluida generó peróxido de hidrógeno, la concentración máxima se produjo a las 36 horas de monitoreo.

De las tres mieles estudiadas, al evaluar las propiedades antioxidantes *in vitro*, la miel de Naranja obtuvo el mayor contenido de compuestos fenólicos, así como la mayor actividad antioxidante. Los compuestos fenólicos presentes en las mieles florales fueron responsables de la actividad antioxidante, éstos son capaces de donar electrones y estabilizar radicales libre, sin embargo, no poseen la capacidad de quelar metales. La participación de la prolina y los azúcares fue mínima o nula.

Los compuestos fenólicos de las mieles evaluadas (Campanilla, Cactáceas y Naranja) sometidas a un proceso de digestión *in vitro* fueron capaces de ser dializados en alrededor del 50 %. La bioaccesibilidad y la actividad antioxidante de éstos compuestos fueron dependientes de la concentración. La miel de Campanilla obtuvo el mejor índice de bioaccesibilidad y en relación a la concentración inicial conservó de mayor manera la actividad antioxidante después de este proceso. Lo que muestra que las propiedades antioxidantes de los alimentos pueden cambiar después de un proceso de digestión como el que se describe en este trabajo.

La miel de Campanilla y su extracto metanólico presentaron los mejores resultados en cuanto a actividad antimicrobiana, inhibieron el crecimiento de todos los microorganismos evaluados. La actividad antimicrobiana de las muestras dependió de diversos factores, entre los que destacan la composición química, en específico, el peróxido de hidrógeno, los compuestos no-peróxido y sus interacciones; así como también la resistencia innata que el microorganismo evaluado presentó contra los compuestos que poseen una actividad inhibitoria.

8. PERSPECTIVAS

Este trabajo generó información valiosa que se puede emplear en posteriores investigaciones, sin embargo, deja algunas interrogantes que pueden ser abordadas y propiciarían un valor agregado significativo. Así como se comprobó que los metabolitos secundarios, compuestos fenólicos, están estrechamente ligados a la actividad antioxidante de las mieles en estudio en ensayos *in vitro*, se propone llevar a cabo un ensayo *in vivo* que corrobore esta información; procesos como la oxidación lipídica en células o estudios en modelos animales podrían generar información interesante que ayude a dilucidar el mecanismo de acción de los compuestos fenólicos presentes en la miel. La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos está estrechamente ligada a la concentración, altas concentraciones producen efectos citotóxicos en sistemas biológicos por lo que la absorción limitada que se observó durante el proceso de digestión *in vitro* (alrededor del 50%) podría favorecer al efecto antioxidante en células animales.

Como observamos en este documento el peróxido de hidrógeno y los compuestos fenólicos generan un estrés en las células de diferentes patógenos en alimentos, este estrés puede retrasar o inhibir el crecimiento y/o matar a las células. Sin embargo, aunque se observó un efecto importante en los microorganismos estudiados queda por determinar los cambios a nivel genético que se producen en la célula en función al estrés producido por los compuestos con actividad antimicrobiana.

Por último, existe el potencial uso para las mieles analizadas como un conservador de alimentos. Diseñar y evaluar productos en los cuales la miel puede actuar como parte de la formulación o como un ingrediente dentro de un empaque y que pueden conferir además de sabores y colores agradables, una protección contra el daño oxidativo y contra agentes microbiológicos patógenos o deterioradores.

9. LITERATURA CITADA

- Al M.L., Daniel D., Moise A., Bobis O., Laslo L., Bogdanov S. 2009. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*. 112: 863-867.
- Al-Naama R.T. 2009. Evaluation of *in vitro* inhibitory effect of honey on some bacterial isolates. *Journal of Bacteriology Research*. 1: 64-67.
- Álvarez-Suarez J.M. Tulipani s., Díaz D., Estevez Y., Romandini S., Giampieri F., Damiani E., Astolfi P., Bompadre S., Battino M. 2010. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color polyphenol content and other chemical compounds. *Food Chemical Toxicology*. 48: 2490-2499.
- Antony S.M., Han I.Y., Rieck J.R., Dawson P.L. 2002. Antioxidative effect of Maillard reaction products added to turkey meat during heating by addition of honey. *Food Chemistry and Toxicology*. 67: 1719-1724.
- Antony S., Rieck J.R., Dawson P.L. 2000. Effect of dry honey on oxidation in turkey breast meat. *Poultry Science*. 79: 1846-1850
- Arias V.C., Castells R.C., Malacalza N., Lupano C.E. and Castells C.B. 2004. Determination of Oligosaccharide Patterns in Honey by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography. *Chromatography*. 58:797:801.
- Arora Z., Nair M.G., Strasburg G.M. 1996. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radical Biology and Medicine*. 24: 1355-1363.
- Arráez-Román D., Gómez-Caravaca A.M., Gómez-Romero M., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. 2006. Identification of phenolic compounds in Rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresis-

- electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1648-1656.
- Augusti J.C. Rosso L., Carlier B. 1999. Estimation of temperature-dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *Journal of Microbiology Methods*. 38: 137-146.
- Baltrusaityte V., Venskutonis P.R., Ceksteryte V. 2007. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry*. 101: 502-514.
- Bang L.M., Bunting C., Molan P. 2003. The effect of dilution on the rate of hydrogen peroxide production in honey and its implications for wound healing. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 9: 267-273.
- Baranyi J., Roberts T.A. 1994. A dynamic approach to predicting the bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*. 23: 277-294.
- Baroni M.V., Arrua C., Nores M.L., Fayé P., Díaz M.P., Chiabrando G.A., Wunderlin D.A. 2009. Composition of honey from Córdoba (Argentina): Assessment of North/South provenance by chemometrics. *Food Chemistry*. 114: 727-733
- Basson N. J., Gliber S.R. 2008. Antimicrobial activity of two South African honey produced from indigenous *Leucospermum cordifolium* and *Erica* species on selected micro-organisms. *Complementary and Alternative Medicine*. 8: 1-4.
- Beretta G., Granata P., Ferrero M., Orioli M., Facino R.M. 2005. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assay and chemometrics. *Analytical Chimica Acta*. 553: 185-191.
- Bermúdez-Soto M.J., Tomás-Barberán F.A., Conesa G. 2007. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*. 102: 865-874.

- Bertoncelj J., Dobersek-Jamnik M., Golob T. 2007. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*. 105: 822-828.
- Bogdanov S., Vit P., Kilchenmann V. 1996. Sugar and conductivity of stingless bee honeys from Venezuela. *Apidologie*. 27: 44-450.
- Bogdanov S. 1997. Natural and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebensm.-Wiss u.-Technol*. 30: 748-753.
- Bogdanov S. 1999. Harmonised methods of the international honey commission. Swiss Bee Research Centre. Pag 45.
- Bogdanov S., Ruoff K., Persano O. 2004. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie*. 35: S4-S17.
- Bors W., Heller W., Michel C., Saran M. 1990. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*. Vol. 8: 343-355 pags.
- Boyer J., Brown D., Liu R.H. 2005. In vitro digestion and lactase treatment influence uptake of quercetina and quercetina glucoside by the Caco-2 cell monolayer. *Nutrition Journal*. 4: 1.
- Brudzynski K. 2006. Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Canadian Journal of Microbiology*. 52: 1228-1237.
- Brul S., Coote P. 1999. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance on the thermal tolerance of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*. 16: 447-458.
- CA, 2001. Codex Alimentarius Commission: Codex standard 12, revised Codex standard for honey standards and standard methods, Vol. 11. *Sperimentale per la Zoologia*, Rome. Available from: <http://www.codexalimentarius.net>.

- Cabrera L., Céspedes E., Nava R., Ojeda de Rodríguez G. 2006. Actividad antibacteriana no-peróxido de mieles Zulianas. Revista científica FCV-LUZ. 16: 556-563.
- Castro-Vázquez L., Díaz-Maroto M.C., González-Viñas M.A., De la Fuente E., Pérez-Coello M.S. 2008. Influence of storage conditions on chemical composition and sensory properties of citrus honey. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56: 1999-2006.
- Codex Alimentarius. Standard for Honey. Ref no. CL 1993/14, SH, Codex Alimentarius Commission FAO/WHO, Rome. 1993.
- Da Costa Leite, J. M., Trugo, L. C., Costa, L. S. M., Quinteiro, L. M. C., Barth, O. M., Dutra, V. M. L., *et al.* 2000. Determination of oligosaccharides in Brazilian honeys of different botanical origin. Food Chemistry, 70, 93–98.
- Davidson P.M., Harrison M.A. 2002. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. Food Technology.56: 69-78.
- de Souza R.F., De Giovani W.F. 2004. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. Redox Report. 9: 97-104.
- Dinis T.C.P., Madeira V.M.C., Almeida L.M. 1994. Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. Archives of Biochemistry and Biophysics. 315: 161-169.
- 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.
- El-Arab A.M. E., Girgis S.M., Hegazy E.M., Abd el-Khalek A.B. 2006. Effect of dietary honey on intestinal microflora and toxicity of mycotoxins in mice. BioMed Central. Pág 1-13.

- Estevinho L., Pereira A.P., Moreira L., Dias L.G. Pereira E. 2008. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 3772-3779.
- Estrada H., Gamboa M.M., Chaves C., Arias M.L. 2005. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja, contra *Staphylococcus aureus*, *Saphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. Evaluación de su carga microbiológica. *Archivo Latinoamericano de Nutrición*. 55: 167-171.
- EU, 2001. Consejo de la Unión Europea. Council Directive 2001/110/ec of 20 December relating to honey. *Official Journal of the European Communities*, 10, 47–52.
- Fangio M.F., Iurlina M.O., Fritz R. 2007. Actividad antimicrobiana de mieles del sudeste de la provincia de Buenos Aires frente a *Escherichia coli*. *Revista Argentina de Microbiología*. 39: 120-123.
- Fernández-Pachón M.S., Villano D., Troncoso A.M., Garcia-Parrilla M.C. 2008. Antioxidant activity of phenolic compounds: from *in vitro* results to *in vivo* evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48: 649-671.
- Ferreira I.C.F.R., Aires E., Barreira J.C.M., Estevinho L.M. 2009. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*. 114: 1438-1443.
- 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.
- Fraga C.G. 2007. Plant polyphenols: how to translate their *in vitro* antioxidant actions to *in vivo* conditions. *IUBMB Life*. 59: 308-315

- Fraga C.G., Galleano M., Verstraeten S.V., Oteiza P.I. 2010. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*. 31: 435-445.
- Franchini R.A.d.A., Costa Matos M.A., Colombara R., Camargo Matos R. 2008. Differential amperometric determination of hydrogen peroxide in honeys using flow-injection analysis with enzymatic reactor. *Talanta*. 75:301-306.
- Freitas M.C., Pacheco A.M.G., Ferreira E. 2006. Nutrients and other elements in honey from Azores and mainland Portugal. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 270: 123–130.
- French V.M., Cooper R.A., Molan P.C. 2005. The antibacterial activity of honey against coagulase-negative staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56: 228-231.
- Fukumoto L.R, Mazza G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 3597-3604.
- Galleano M., Verstraeten S.V., Oteiza P.I., Fraga C. 2010. Antioxidant actions of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 501: 23-30.
- Gheldof N., Wang X., Engeseth N.J. 2002. Identification and quantification of antioxidant components of honey from various floral sources. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50: 5870-5877.
- Gidamis A.B., Chove B.E., Shayo N.B., Nnko S.A., Bangu N.T. 2004. Quality evaluation of honey harvested from selected areas in Tanzania with special emphasis on hydroxymethylfurfural (HMF) levels. *Plant Foods for Human Nutrition*. 59: 129-132.
- Gil-Izquierdo A., Zafrilla P., Tomás-Barberán F.A. 2002. An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the

- gastrointestinal tract. *European Food Research and Technology*. 214: 155-159.
- Gomes S., Dias L.G., Moreira L.L., Rodrigues P., Estevinho L. 2010. Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 544-548.
- González-Miret M.L., Terrab A., Hernández D., Fernández-Recamales M.A., Heredia F.J. 2005. Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and their botanical origin. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 53: 2574-2580.
- Hemery Y.M., Anson N.M., Havenaar R., Haenen G.R.M.M., Noort M.W.J., Rouau X. 2010. Dry-fractionation of wheat bran increases the bioaccessibility of phenolic acids in breads made from processed bran fractions. *Food Research International*. 43: 1429-1438.
- Howe R.A., Brown N.M., Spencer R.C. 1996. The new threats of Gram positive pathogens; reemergence of things past. *Journal of Clinical Pathology*. 49: 444-449.
- Isla M.I., Craig A., Ordoñez R., Zampini C., Sayago J., Bedascarrasbure E., Alvarez A., Salomón V., Maldonado L. 2011. Physicochemical and bioactive properties of honeys from Northwestern. *LWT-Food Science and Technology*. 44: 1922-1930.
- Iurlina M.O., Fritz R. 2005. Characterization of microorganism in Argentinean honeys from different sources. *International Journal of Food Microbiology*. 105: 297-304.
- Jovanovic S.V., Steenken S., Tomic M.m Marjanovic B., Simic M.G. 1994. Flavonoids as antioxidants. *Journal of American Chemical Society*. 116: 4846-4851.

- Juszczack L., Socha R., Roznowski J., Fortuna R., Nalepka K. 2009. Physicochemical properties and quality parameters of herbhoney. *Food Chemistry*. 110:538-542.
- Kanafani Z.A., Fowler V.G. 2006. *Staphylococcus aureus* infections; new challenges from an old pathogen. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 24:182-193.
- Küçük M., Kolayh S., Karaoglu S., Ulusoy E., Baltaci C., Candan F. 2007. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*. 100: 526-534.
- Kumar V., Kumar-Yadav S. 2009. Proline and betaine provide protection to antioxidant and methylglyoxal detoxification systems during cold stress in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Acta Physiologiae Plantarum*. 31: 261-269.
- Kwakman P.H.S., te Velde A.A., de Boer L., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E, Zaat S.A.J. 2011. Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity. *Plos One*. 6-e17709:1-7.
- Li H., Wang X., Li Y., Li P., Wang H. 2009. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chemistry*. 112: 454-460.
- Loarca-Piña G., Mendoza S., Ramos-Gómez M., Reynoso R. 2010. Antioxidant, antimutagenic, and antidiabetic activities of edible leaves from *Cnidioscolus chayamansa* Mc. Vaugh. *Journal of Food Science* 75: 68-72.
- McDougall G.J., Dobson P., Smith P., Blake A., Stewart D. 2005. Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 5896-5904.
- McMeeking T.A., Olley J.N., Ross T., Ratkowsky D.A. 1993. Optical density methods. *Predictive microbiology*. United Kingdom, Wiley, Chichester. 31-34 p.

- Meda A., Lamien C.E., Romito M., Millogo J., Nacoulma O.G. 2005a. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*. 91: 571-577,
- Meda A., Lamien C.E., Millogo J., Romito M., Nacoulma O.G. 2005b. Physicochemical analyses of Burkina Fasan honey. *Acta Veterinaria Brno*. 74: 147-152.
- Miorin P.L., Levy-Junior N.C., Custodio A.R. Bretz W.A., Marcucci M.C. 2003. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetraglisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 913-920.
- Mohammed S.E.A.R., Babiker E.E. 2010. Identification of the floral origin of honey by amino acids composition. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 4: 552-556.
- Moret I., Abaléa V., Sergent O., Cillard P., Cillard J. 1998. Involvement of phenoxy radical intermediates in lipid antioxidant action of myricetin in iron treated rat hepatocyte culture. *Biochemical Pharmacology*. 55: 1399-1404.
- Mundo M.A., Padila-Zakour O.I., Worobo R.W. 2004. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology*. 97:1-8.
- Muñoz O., Copaja S. 2007. Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. *Química Nova*. 30:848-851.
- Nagai T., Inove R., Kamamori N., Suzuki N., Hagashima T. 2006. Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. *Food Chemistry*. 97: 256-262.
- Nanda V., Sarkar B.C., Sharma H.K., Bawa A.S. 2003. Physico-chemical properties and estimation of mineral content in honey produced from different plants in Northern India. *Journal of Food Composition Analysis*. 16:613-6119.

- Neidhardt, F.C., VanBogelen R.A.. 2000. *Bacterial Stress Responses*. G. Storz and R. Hengge-Aronis, Eds. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press, pp. 445–452.
- Neilson A.P., Hopf A., Cooper B.R., Pereira M.A., Bomser J.A., Ferruzzi M.G. 2007. Catechin degradation with concurrent formation of homo- and heterocatechin dimmers during *in vitro* digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 8941-8949.
- Nenadis N., Wang L.F., Tsimidou M., Zhang H.Y. 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS^{•+} assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 4669-4674.
- Olaitan P.B., Adeleke O.E., Ola I.O. 2007. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitor agent for microbes. *African Health Science*. 7:159-165.
- Omafuvbe B.O., Akanbu O.O. 2009. Microbiological and physico-chemical properties of some commercial Nigerian honey. *African Journal of Microbiology Research*. 3: 891-896.
- Ortega N., Reguant J., Romero M.P., Macia A., Motilva, M.J. 2009. Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an *in vitro* digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 5743-5749.
- Ouchemoukh S., Schweitzer P., Bachir Bey M., Djoudad-Kadji H., Louaileche H. 2010. HPLC sugar profiles of Algerian honeys. *Food Chemistry*. 121: 561-568.
- Ozden M., Demirel U., Kahraman A. 2009. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine exposed to oxidative stress by H₂O₂. *Scientia Horticulture*. 119: 163-168.
- Ozkorucuklu S.P., Beltrán J.L., Fonrodona G., Barrón D., Alsancak G., Barbosa J. 2009. Determination of dissociation constants of some hydroxylated benzoic

- and cinnamic acids in water from mobility and spectroscopic data obtained by CE-DAD. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 54: 807-811.
- Patton T., Barret J., Brennan J., Moran N. 2006. Use of spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to Manuka honey. *Journal of Microbiological Methods*. 64: 84-95.
- Pérez E., Rodríguez-Malaver A.J., Vit P. 2006. Antioxidant capacity of Venezuelan Honey in Wistar Rat Homogenates. *Journal of Medicinal Food*. 9: 510-516.
- Pichihero E., Canuti L., Canini A. 2009. Characterisation of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 89: 609-616.
- Piljac-Zegarac L., Stipčević T., Belščak A. 2009. Antioxidant properties and phenolic content of different floral origin honeys. *Journal of ApiProduct and ApiMedicine Science* 1:43-50.
- Pruneda E., Peralta-Hernández J.M., Esquivel K., Lee S.Y., Godínez L.A, Mendoza S. 2008. Water vapor permeability, mechanical properties and antioxidant effect of Mexican oregano-soy based edible films. *Food Chemistry*. 73: C488-C493.
- Saxena S., Gautam S., Sharma A. 2010. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chemistry*. 118: 391-397.
- Sicili S., Sagdic O., Ekici L. 2010. Total phenolic content, atiradical, antioxidant and antimicrobial activities of *Rhododendron* honeys. *Food Chemistry*. 121: 238-243.
- Ren J., Meng S., Lekka Ch.E., Kaxiras E. 2008. Complexation of flavonoides with iron: structure and optical signature. *Journal of Physical Chemistry*. 112: 1845-1650.

- Rush J.D., Maskos A., Koppenol W.H. 1990. Reactions of iron (II) nucleotide complexes with hydrogen peroxide. FEBS. 261: 121-123.
- SAGARPA (Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación), 20011. www.aserca.gob.mx. 25 de septiembre de 2011. México, D.F.
- Shamal T.R., Jyothi Y.P.S., Saibaba P. 2002. Antibacterial effect of honey on the *in vitro* and *in vivo* growth of *Escherichia coli*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 18: 863-865.
- Sherlock O., Dolan A., Athman R., Power A., Gethin G., Cowman S., Humphrey H. 2010. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Complementary and Alternative Medicine. 10: 47-51.
- Soobrattee M.A., Neergheen V.S., Luximon-Ramma A., Aruoma O.I., Bahorun T. 2005. Phenolic as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. Mutation Research. 579: 200-213.
- Tagliazucchi D., Verzelloni E., Bertolini D., Conte A. 2010. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. Food Chemistry. 120: 599-606.
- Taomari P.J., Niemira B.A., Beuchat L.R. 2001. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. International Journal of Food Microbiology. 69: 217-225.
- Turhan I., Tetik N., Karhan M., Gurel F., Tavukcuoglu H.R. 2008. Quality of honeys influenced by thermal treatment. LWT. 41: 1396-1399.
- Vela L., Lorenzo C., Pérez R.A. 2007. Antioxidant capacity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and other physicochemical properties. Journal of the Sciences of Food and Agriculture. 87: 1069-1075.

- Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Zaldivar-Cruz J.M. Kuri V., Fernández-López J., Carbonell-Barrachina A.A., Pérez-Álvarez J.A. 2010. Aroma profile and physico-chemical properties of artisanal honey from Tabasco, Mexico. *International Journal Food Science and Technology*. 45: 1111-1118.
- Vorlova L., Kaspiskova R., Chabiniokova I., Kalabova K., Bradova Z. 2005. The antimicrobial activity of honeys produced in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*. 5: 376-384.
- Weston R.J., Mitchell K.R., Allen K.L. 1999. Antibacterial phenolic components of New Zealand Manuka honey. *Food chemistry*. 64: 295-301.
- Yao L., Jiang Y., Singanusong R., D'Arcy B., Datta N., Caffin N., Raymont K. 2004. Flavonoids in Australian *Melaleuca*, *Guioa*, *Lophostemon*, *Banksia* and *Helianthus* honeys and their potential for floral authentication. *Food Research International*. 37: 166-174.
- Yao L., Jian Y., Singanusong R., Datta N., Raymont K. 2005. Phenolic acids in Australian *Melaleuca*, *Guioa*, *Lophostemon*, *Banksia* and *Helianthus* honeys and their potential for floral authentication. *Food Research International*. 38: 651-658.
- Yousef A.E., Juneja V.K. 2003. *Microbial stress adaptation and food safety*. Ed CRC Press. Boca Raton, London, New York and Washington, D.C.
- 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.

ANEXO

Quality Parameters and Antioxidant
and Antibacterial Properties of Some
Mexican Honeys

Quality Parameters and Antioxidant and Antibacterial Properties of Some Mexican honeys

Beatriz A. Rodríguez, Sandra Mendoza, Montserrat H. Iturriga, and Eduardo Castaño-Tostado

Abstract: A total of 14 Mexican honeys were screened for quality parameters including color, moisture, proline, and acidity. Antioxidant properties of complete honey and its methanolic extracts were evaluated by the DPPH, ABTS, and FRAP assays. In addition, the antimicrobial activity of complete honeys against *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 was determined. Most of honeys analyzed showed values within quality parameters established by the Codex Alimentarius Commission in 2001. Eucalyptus flower honey and orange blossom honey showed the highest phenolic contents and antioxidant capacity. Bell flower, orange blossom, and eucalyptus flower honeys inhibited the growth of the 4 evaluated microorganisms. The remaining honeys affected at least 1 of the estimated growth parameters (increased lag phase, decreased growth rate, and/or maximum population density). Microorganism sensitivity to the antimicrobial activity of honeys followed the order *B. cereus* > *L. monocytogenes* > *Salmonella* Typhimurium > *S. aureus*. The monofloral honey samples from orange blossoms, and eucalyptus flowers demonstrated to be good sources of antioxidant and antimicrobial compounds. All the Mexican honey samples examined proved to be good sources of antioxidants and antimicrobial agents that might serve to maintain health and protect against several diseases.

Keywords: antimicrobial properties, antioxidant properties, Mexican honey, phenolic compounds, quality parameters

Practical Application: The results of the study showed that Mexican honeys display good quality parameters and antioxidant and antimicrobial activities. Mexican honey can be used as an additive in the food industry to increase the nutraceutical value of products.

Introduction

Honey is a complex mixture produced by honeybees from the nectar and also exudates from plants and it is consumed as a sweetener as well as for its therapeutic properties. Honey is a super-saturated solution of sugars with fructose and glucose as main saccharides.

Honey quality criteria are defined by the Codex Alimentarius (CA 2001). Honey color is an important quality criterion for the botanical origin of honey (Bogdanov and others 2004). Proline is the major amino acid in honey and a measure of honey authenticity, its minimum value for genuine honey is 180 mg/kg honey (CA 2001). The water content is important for honey stability, while the acidity content of honey is a function of honey fermentation. Honeys from the tropics with high water content tend to ferment readily and the free acidity is increased. CA prescribes a maximum value of 50 milliequivalents of free acids per kilogram.

Antimicrobial effects of honey against microorganism associated with disease or infection, food spoilage, including foodborne pathogens and yeasts, have been reported and honey biological activity has been attributed not only to the high sugar concentration and hydrogen peroxide production but also to different

compounds such as acids, phenolics, proteins, and carbohydrates (Gheldof and others 2002; Olasupo and others 2003; Mundo and others 2004; Guerrini and others 2009; Gomes and others 2010).

Besides, honey phenolic content has been correlated with the observed antioxidant capacity of honey samples (Beretta and others 2005; Meda and others 2005; Pérez and others 2006; Bertonecelj and others 2007; Vela and others 2007; Zalibera and others 2008; Ferreira and others 2009).

As in other parts of the world, in Mexico traditional medicine also uses honey as an antibacterial and antiinflammatory agent and for the treatment of cough and skin injuries. The rich Mexican flora biodiversity can provide honeys with various interesting biological properties. The main objective of this study was to evaluate the antioxidant and antimicrobial properties of some multifloral and monofloral Mexican honeys.

Material and Methods

Honey samples

A total of 14 commercial honeys were obtained from exhibitions of local apiarists. The floral source of each honey was provided by the apiarist (Table 1). Honeys were kept at room temperature until further analysis.

Quality parameters

Color parameters (L^* , a^* , and b^*) were established with the CIELAB system by the reflection method using a CM 3500D spectrophotometer (Konica-Minolta, Mahwah, N.J., U.S.A.).

MS 20110902 Submitted 7/26/2011, Accepted 10/4/2011. Authors are with Dept. de Investigación y Posgrado en Alimentos, Facultad de Química, Univ. Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas s/n, Querétaro, Qro., 76010, México. Direct inquiries to author Mendoza (E-mail: smendoza@uaq.mx).

The proline, water, and total and free acidity contents were measured according to methods described by the AOAC (2000) (Official Methods 979.20, 969.38, 962.19). All measurements were carried out in triplicate and reported as the mean value \pm standard error.

Extraction

The procedure for the extraction of phenolics from the honey samples was adapted from Baltrušaitytė and others 2007. Briefly, honey (30 g) was dissolved in 250 mL acidified water (pH 2) and filtered through an Amberlite XAD-2 resin column. Sugar and polar compounds were eluted with acidified water (250 mL); the column was washed with 300 mL neutral water, and the phenolic compounds were recovered with methanol (250 mL). The methanolic extract was concentrated to dryness in a rotary evaporator and stored at 4 °C for later use.

A sugar analog (SA) was prepared and used as control to consider any contribution to the measurements by sugars: 1.5 g sucrose, 7.5 g maltose, 40.5 g fructose, and 33.5 g glucose were dissolved in 17 mL water (Piljac-Zegarac and others 2009).

Phenolic content and antioxidant capacity

Total phenolic content. The total phenolic content procedure was adapted from Zalibera and others (2008) with some modifications. To the sample of honey or methanolic extract (50 μ L) was added 125 μ L of Folin-Ciocalteu reagent. The mixture was sonicated for 5 min, then 625 μ L of sodium carbonate was added and the absorbance was determined after 2 h at 760 nm. Results were expressed as milligram of gallic acid equivalents per kilogram of honey (mg GA/kg).

DPPH method. Antiradical activity (ARA) was determined using the stable radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), according to the method reported by Loarca-Piña and others 2010. Total of 20 μ L of sample dissolved in methanol (honey 10% [w/v], extract 2 mg/mL) was mixed with 200 μ L of 150 μ M of DPPH in 80% methanol. The absorbance was read at 520 nm after 0, 4, 10, 30, 60, and 90 min. The measurement was performed in triplicate.

ABTS method. The estimation of the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) was performed using the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6- sulfonic acid (ABTS) assay described by Loarca-Piña and others (2010). Briefly, 20 μ L of sample dissolved in methanol (honey, 10% [w/v], extract 2 mg/mL) were mixed with 230 mL of ABTS+ solution. The absorbance was read at ambient temperature after 0, 4, 10, 30, 60, and 90 min. The

measurement was performed in triplicate. The TEAC value was calculated employing a Trolox calibration curve and expressed as μ mol of Trolox equivalents per kilogram of honey (μ mol Trolox/kg).

Ferric reducing antioxidant power (FRAP). FRAP values were obtained according to the method reported by Firuzi and others (2005). Briefly, 75 μ L sample of sample dissolved in methanol (honey, 10% [w/v], extract 2 mg/mL) was placed in a 96-well microplate (Nalge Nunc Intl., N.Y., U.S.A.). Then 175 μ L of freshly prepared and warm (37 °C) FRAP solution was added. The absorbances at 595 nm were monitored by a Spectra Max tunable microplate reader (Molecular Devices Co., Sunnyvale, Calif., U.S.A.) at 0, 4, 10, 30, and 60 min. Blanks were prepared and a standard curve of FeSO₄ was obtained. The results were expressed as micromol of FeSO₄ equivalents per kilogram of honey (μ mol FeSO₄/kg) at 30 min. All data were reported as means \pm standard error.

Antimicrobial properties

Bacterial strains and inoculum preparation. Total of 4 strains were used in this study: *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Cultures were maintained at 4 °C on tryptic soy agar (Difco Lab., Sparks, Md., U.S.A.) slants. Three successive loop transfers to tryptic soy broth (Difco) were made at 37 °C and 24-h intervals before cells from a 20-h culture were collected by centrifugation (3500 \times g, 15 min, 22 °C). Each pellet was washed twice with 0.85% sodium chloride (saline) and resuspended in saline. Serial 10-fold dilutions of each cell suspension were prepared in saline solution to obtain the desired cell concentration (1×10^3 CFU/mL). The population in the inoculum was determined by pour-plating samples on TSA; plates were incubated at 35 °C for 24 h before colonies were counted. Honeys were diluted in trypticase soy broth (TSB) to a final concentration of 10% (w/v) and sterilized by filtration (220 μ m pore size). Each diluted honey was inoculated with 5 μ L of diluted cell cultures to get a final concentration of 1×10^3 CFU/mL.

Growth kinetics

Samples from each inoculated diluted honey were dispensed (250 μ L) into wells of a Bioscreen plate (Labsystems Corp., Helsinki, Finland). The plates were loaded into the Bioscreen C Analyzer system (Labsystems Corp.) operating at an incubation temperature of 37 °C. Absorbance measurements were determined using a wide-band filter, at 10 min intervals, after shaking at medium intensity for 10 s. Plates were incubated for 48 h. Optical density was determined every 30 min at 620 nm.

Statistical analysis

Microorganism growth kinetic parameters were estimated (grow rate, μ ; lag phase duration, and maximum population density, MPD) fitting the model of Baranyi and Roberts (1994) by the DMFit Excel Add-In available via the ComBase web site (www.combase.cc). Other statistical analyses were performed using JMP 5.0.1 software. Results are expressed as means \pm SD. Data were analyzed by one-way ANOVA. Statistical differences at $\alpha = 0.05$ were determined by Tukey's test. Correlations were calculated. Star plot was created using package R version 2.11.1 (2010 The R Foundation for Statistical Computing www.project-r.org).

Table 1—Floral origin and scientific name of Mexican honeys used in this study.

Code	Floral origin	Scientific name
H1	Multifloral	—
H2	Multifloral	—
H3	Multifloral	—
H4	Multifloral	—
H5	Multifloral	—
H6	Bell flower	<i>Campanula persicifolia</i>
H7	Cactus flower	<i>Opuntia ficus-indica</i>
H8	Orange blossom	<i>Citrus sinensis</i>
H9	Orange blossom	<i>Citrus sinensis</i>
H10	Bell flower	<i>Campanula persicifolia</i>
H11	Cactus flower	<i>Opuntia ficus-indica</i>
H12	Eucalyptus flower	<i>Eucalyptus globulus labill</i>
H13	Caujiniquil flower	<i>Inca punctata</i> (Willd)
H14	Eucalyptus flower	<i>Eucalyptus globulus labill</i>

Results and Discussion

Quality parameters

As shown in Table 1, of 14 representative Mexican honey samples 5 were multifloral and 9 monofloral. The results of the analysis of quality parameters, such as pH, color, moisture, total and free acid, and proline content are summarized in Table 2. These quality parameters are related to honey maturity, production methods, environmental conditions, and the nectar source. The moisture content of honey is an important factor contributing to its stability against fermentation and granulation during storage; it can be affected by climate, season, and moisture content of the original flower nectar (Nanda and others 2003). The analyzed samples showed moisture values ranging from 15.5% to 20.7%. Sample H1 had moisture content higher than allowed by the Intl. Honey Standard (20%) (CA 2001). Proline is the major amino acid in honey and the minimum value for genuine honey is given as 180 mg/kg (CA 2001). The proline content values ranged from 146 to 877.6 mg/kg. These results are in agreement with reported values for honey from Argentina 166 to 708 mg/kg (Baroni and others 2009). The acidity of honey is attributed to the presence of organic acids and can be related to floral type and extraction season (Nanda and others 2003; Bogdanov and others 2004). The total acidity values showed a range from 13.4 to 46.8 meq/kg. Values for total acidity were similar to the reported values for honeys from India, Poland, and Tanzania (Nanda and others 2003; Gidamis and others 2004; Juszczack and others 2009). Values for free acidity in all samples were less than 50 meq/kg (12.5 to 44.4 meq/kg), the maximum allowed value established by the Codex Alimentarius (CA 2001).

Sample H10 had 146 mg/kg of proline content, suggesting that this sample had probably been adulterated; however, based on the other evaluated quality parameters, such as moisture (16.8), total acidity (42.2), free acidity (39.9), and pH (3.6) it can be noted that this sample is within specifications. The low proline value could be related to floral origin and climatic conditions (Nanda and others 2009).

The color of natural honey is often an indication of its botanical origin and is closely related to the secondary metabolites (Bertoncelj and others 2007). The color parameters of honey samples are indicated in Table 2. The parameter L^* , reflecting brightness, showed a range from 14.4 to 31.6, while sample H7 showed the lightest color (31.6), sample H8 had the darkest color

(14.4). González-Miret and others (2005) classified honey into 2 groups from the point of view of lightness: light honeys with $L^* > 50$ and dark honeys with $L^* < 50$. In this sense, all the analyzed samples can be considered dark honeys. For the red-green (a^*) and yellow-blue (b^*) coordinates, the obtained values ranged from 0.1 to 15.6 and 17.2 to 38.1, respectively. These values indicate that the honey samples showed a large proportion of red and yellow color. The color in honey is a determinant factor for consumer acceptability (Viuda-Martos and others 2010).

Phenolic content and antioxidant properties

Since phenolic substances have been shown to be responsible for the antioxidant activity of honey, the total phenol content of the honey samples and its methanolic extracts were investigated (Table 3 and 4). The values showed a range of 283.9 to 1142.9 and 79.43 to 522.6 mg GA/kg, respectively. For complete honey, sample H8 (1142.8 mg GA/kg) had the highest value of phenolics, while sample H11 (283.88 mg GA/Kg) had the lowest value. Similar phenolic contents were reported for Croatian (126–905.7) (Piljac-Žegarac and others 2009), Burkina Fasan (325.9–1147.5) (Meda and others 2005), and Portuguese honeys (132.1–727.7) (Bertoncelj and others 2007). For the monofloral samples, the

Table 3—Total phenol content and antioxidant capacity of 14 Mexican honeys analyzed.

	Total phenolic mg GA/kg	ABTS	DPPH	FRAP μ mol FeSO ₄ /kg
		μ mol Trolox/kg		
Multifloral				
SA	79.3 \pm 2.2	76.8 \pm 4.3	0.0 \pm 2.9	182.6 \pm 3.6
H1	359.1 \pm 30.2	1274.7 \pm 34.0	81.9 \pm 11.3	897.4 \pm 26.9
H2	526.5 \pm 34.9	1521.0 \pm 51.3	109.1 \pm 7.6	1672.4 \pm 55.3
H3	751.8 \pm 49.3	2261.9 \pm 17.9	134.3 \pm 8.7	1831.9 \pm 28.8
H4	646.1 \pm 32.3	1349.2 \pm 31.6	109.0 \pm 13.6	1010.9 \pm 3.1
H5	1088.1 \pm 36.0	2030.9 \pm 86.7	153.7 \pm 4.8	1695.8 \pm 58.0
Monofloral				
H6	543.8 \pm 62.6	1901.1 \pm 14.0	122.4 \pm 7.6	1434.4 \pm 40.6
H7	506.4 \pm 44.0	1521.9 \pm 27.0	93.6 \pm 9.9	1167.4 \pm 25.7
H8	1142.9 \pm 41.3	2368.7 \pm 53.0	211.8 \pm 13.6	3097.1 \pm 115.3
H9	727.0 \pm 14.7	2105.6 \pm 97.9	157.4 \pm 8.6	1671.1 \pm 44.7
H10	1036.4 \pm 62.5	1918.4 \pm 15.0	106.0 \pm 4.2	1113.5 \pm 45.7
H11	283.9 \pm 24.7	910.2 \pm 15.5	94.8 \pm 3.7	749.4 \pm 27.9
H12	838.6 \pm 32.7	1779.5 \pm 114.3	200.0 \pm 3.4	1480.8 \pm 91.1
H13	612.3 \pm 18.3	1704.7 \pm 25.1	147.9 \pm 5.2	2432.1 \pm 164.3
H14	913.3 \pm 75.5	2927.4 \pm 44.6	255.0 \pm 1.9	2476.7 \pm 39.9

Results are the averages of 3 independent experiments \pm SE.

Table 2—Quality parameter in 14 Mexican honeys analyzed.

	Moisture (%)	Proline (mg/kg)	L^*	a^*	b^*	Total acidity (meq./kg)	Free acidity (meq./kg)	pH
Multifloral								
H1	20.7 \pm 0.1	282.8 \pm 11.2	24.6 \pm 2.0	6.5 \pm 1.2	29.6 \pm 2.7	21.8 \pm 1.0	18.3 \pm 0.1	3.5 \pm 0.0
H2	17.6 \pm 0.4	369.7 \pm 13.6	27.3 \pm 0.4	10.5 \pm 1.6	36.8 \pm 1.1	26.4 \pm 0.3	27.7 \pm 0.3	3.6 \pm 0.0
H3	16.5 \pm 0.3	225.7 \pm 20.2	23.2 \pm 0.2	15.6 \pm 0.3	30.1 \pm 2.5	32.6 \pm 0.5	32.2 \pm 0.9	3.7 \pm 0.0
H4	18.0 \pm 0.0	464.5 \pm 12.0	25.5 \pm 0.5	7.8 \pm 0.5	22.1 \pm 0.8	32.4 \pm 0.4	29.9 \pm 0.6	3.5 \pm 0.0
H5	17.8 \pm 0.4	359.4 \pm 1.4	18.7 \pm 0.5	6.0 \pm 0.2	18.6 \pm 1.3	36.1 \pm 0.1	35.8 \pm 0.8	3.8 \pm 0.0
Monofloral								
H6	18.5 \pm 0.1	441.3 \pm 29.1	22.3 \pm 0.6	5.7 \pm 0.2	24.2 \pm 1.0	46.8 \pm 3.8	44.4 \pm 0.7	3.5 \pm 0.0
H7	17.7 \pm 0.6	439.3 \pm 8.9	31.6 \pm 0.5	7.0 \pm 0.2	38.1 \pm 1.1	18.8 \pm 0.2	19.1 \pm 0.5	4.0 \pm 0.0
H8	19.2 \pm 0.0	307.7 \pm 4.4	14.4 \pm 0.8	14.9 \pm 0.9	30.9 \pm 0.8	39.0 \pm 0.8	37.6 \pm 0.7	4.0 \pm 0.0
H9	16.5 \pm 0.1	305.9 \pm 9.3	20.5 \pm 0.8	7.5 \pm 0.5	32.9 \pm 1.6	44.4 \pm 4.7	42.9 \pm 1.6	3.6 \pm 0.0
H10	16.8 \pm 0.1	146.0 \pm 2.8	26.1 \pm 0.3	8.7 \pm 0.2	18.6 \pm 1.3	42.2 \pm 1.8	39.9 \pm 0.9	3.6 \pm 0.0
H11	16.2 \pm 0.4	220.5 \pm 2.4	27.9 \pm 0.5	0.1 \pm 0.1	17.2 \pm 0.8	13.3 \pm .13	13.7 \pm 0.0	3.7 \pm 0.0
H12	15.5 \pm 0.4	387.4 \pm 3.7	27.5 \pm 0.4	11.1 \pm 0.6	35.6 \pm 0.2	13.4 \pm 1.2	12.5 \pm 0.3	5.0 \pm 0.0
H13	18.0 \pm 0.1	569.4 \pm 2.4	27.5 \pm 0.4	13.6 \pm 0.1	34.9 \pm 0.4	37.9 \pm 0.3	38.3 \pm 0.2	3.6 \pm 0.0
H14	16.0 \pm 0.2	877.6 \pm 15.1	24.0 \pm 0.8	10.0 \pm 0.6	29.5 \pm 0.9	27.7 \pm 0.2	27.2 \pm 0.4	4.2 \pm 0.0

Results are the averages of 3 independent experiments \pm SE.

orange blossom (H8, H9) and eucalyptus flower (H12, H14) honeys showed the highest total phenol values, while the bell (H6) and cactus (H7, H11) flower honeys had the lowest total phenol values. For the methanolic extracts, samples H12 (522 mg GA/kg) and H13 (516.5 mg GA/Kg) showed the highest value of phenolics and sample H6 (79.4 mg GA/Kg) the lowest. The value of total phenols for the sugar analog (SA) was 79.3 mg GA/kg due to the reaction of its reducing sugars with the Folin reagent. According to the results, the contribution of SA to the phenolic content of the honey is small. It can be suggested that the higher total phenol values observed for the complete honey samples H8, H9, and H14, compared with their respective methanolic extracts, may be due to the presence of nonphenolic reducing substances such as amino acids, enzymes, and other compounds. As can be noticed in the case of sample H10, where adulteration was suggested taking into account the proline parameter, the phenolic content of the complete honey was very high while the phenolic content of its extract was low. The methanolic extracts of the Mexican honeys from orange blossoms (H8), eucalyptus flowers (H12), and caujiniquil flowers (H13) showed higher values of phenolics compared with reported values for methanolic extracts from Italian honeys (60.5 to 276 mg GA/kg) (Pichichero and others 2009).

Free radicals play an important role in chronic diseases related to oxidative stress, such as diabetes, cancer, and cardiovascular pathologies (Soostratee and others 2005). In this study, 3 *in vitro* assays were used to determine antioxidant capacity. The ABTS and DPPH assays were performed to measure the free radical scavenging activity of samples, and FRAP assay to evaluate the total antioxidant activity through the capacity of the samples to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} ions.

The calculated TEAC ($\mu\text{mol Trolox/kg}$) values of honey samples and the methanolic extracts in both assays are shown in Table 3 and 4, respectively. Solutions of 10% honey demonstrated, for DPPH and ABTS assays, TEAC values from 81.9 to 255.0 and 910.2 to 2927.4 $\mu\text{mol Trolox/kg}$, respectively. Sample H14 (eucalyptus flowers) showed the highest antiradical capacity. Solutions of 2 mg/mL of the methanolic extracts showed, for DPPH and ABTS assays, TEAC values from 14.1 to 105.6 and 241.2 to 1677 $\mu\text{mol Trolox/kg}$, respectively. The methanolic extract of sample H12 (eucalyptus flowers) showed the highest antiradical

capacity. In the case of the SA, for both DPPH and ABTS assays, the results were lower compared with the analyzed samples (0 and 76.8 $\mu\text{mol Trolox/kg}$, respectively).

To measure the total reducing power, the FRAP assay was performed. As can be observed in Table 3 and 4, values ranging from 897.4 to 3097.1 and 692 to 3519.8 $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{kg}$ were obtained for the complete honey and methanolic extracts, respectively.

The honey TEAC values for the ABTS assay were higher compared with the reported values for Slovak honeys (180 to 1110 $\mu\text{mol Trolox/kg}$, respectively) (Zalibera and others 2008; Alvarez-Suarez and others 2010). The ABTS and FRAP values of the evaluated Mexican honeys were similar to the reported values of Cuban honeys (210 to 2940 $\mu\text{mol Trolox/kg}$ and 130 to 1960 $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{kg}$, respectively) (Alvarez-Suarez and others 2010). Regarding the FRAP values for the methanolic extracts of Mexican honeys, these results were similar to the reported data of methanolic extracts from Italian honeys (1200 to 4400 $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{kg}$) (Pichichero and others 2009). For DPPH, ABTS, and FRAP assays, no correlation between the antiradical capacity of honey and its respective methanolic extract was observed. These results suggest that there are other compounds besides the secondary metabolites with antioxidant activity in the honey matrix of the analyzed Mexican samples; these compounds could be enzymes, ascorbic acid, and others.

Antimicrobial properties

Diluted honeys (10%) were tested against *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, and *S. aureus*. The values of growth rate, lag phase duration, and MPD are shown in Table 5. All honeys inhibited the growth of *B. cereus*. The honeys with the best antimicrobial activity were H6, H10 (bell flower), H9 (orange blossom), and H14 (eucalyptus flower); they all inhibited the growth of the 4 evaluated microorganisms. The remaining honeys affected at least 1 of the estimated growth parameters (Table 5). Microorganism sensitivity to the antimicrobial activity of honeys followed the order: *B. cereus* > *L. monocytogenes* > *S. Typhimurium* > *S. aureus*. In general, when complete inhibition of the microorganism was not observed, the presence of honey in TSB extended the lag phase, reduced the growth rate, and in some cases also affected the MPD. On average, the lag phase duration was 17.5, 6.4, and 10.9 h for *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, and *S. aureus*, respectively. The growth rate showed values of 0.15, 0.081, and 0.1 OD/h for *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, and *S. aureus*, respectively. MPD ranged from 0.5 to 0.6 OD. In this regard, a steady stationary phase was not obtained for *S. Typhimurium* in the presence of honeys H1, H4, H5, H8, and H11, the growth of the microorganism continued until the end of the study (48 h).

The antimicrobial activity of honey has been documented previously. It has been attributed to its high sugar concentration and low water activity, to the presence of hydrogen peroxide generated by glucose oxidase, and nonperoxide compounds such as phenolic compounds (Mundo and others 2004). Reports describing the inhibition of growth of numerous bacteria of clinical significance such as *S. aureus*, *E. coli*, and *S. Typhimurium* have been published (Shamala and others 2002; Miorin and others 2003; Vorlova and others 2005). However, there is lack of information regarding the effect of honey on many foodborne pathogens. In this respect, in a study conducted by Taormina and others (2001) the inhibition of growth of *S. sonnei*, *L. monocytogenes*, and *S. aureus* in 25% solutions of floral honeys was observed. When tested honeys were treated with catalase solution the inhibition was reduced, indicating that honey peroxide contributes to the antimicrobial activity.

Table 4 –Total phenolic content and antioxidant capacity of 14 methanolic extracts of Mexican honeys methanolic extracts.

	Total phenolic mg equi. GA/ kg	ABTS	DPPH	FRAP
		$\mu\text{mol equi. Trolox/kg}$	$\mu\text{mol Trolox/kg}$	$\mu\text{mol FeSO}_4/\text{kg}$
		Multifloral		
H1	121.5 ± 9.8	349.7 ± 14.2	24.8 ± 4.7	692.0 ± 37.6
H2	142.5 ± 2.1	366.0 ± 9.2	22.3 ± 2.5	893.9 ± 77.0
H3	198.3 ± 11.4	660.7 ± 16.2	34.0 ± 4.6	1481.7 ± 153.4
H4	105.0 ± 5.6	361.9 ± 8.6	15.5 ± 1.2	673.6 ± 25.7
H5	193.5 ± 9.8	686.2 ± 28.1	25.4 ± 5.3	1276.5 ± 79.3
		Monofloral		
H6	79.4 ± 3.4	357.8 ± 7.3	16.6 ± 1.3	625.2 ± 25.7
H7	142.5 ± 2.6	393.3 ± 16.3	32.8 ± 3.5	1112.8 ± 61.1
H8	363.8 ± 7.1	1146.1 ± 31.2	75.6 ± 4.0	2646.1 ± 85.6
H9	163.9 ± 10.1	522.3 ± 18.7	24.8 ± 3.4	1236.0 ± 29.0
H10	140.6 ± 10.2	494.9 ± 17.3	16.4 ± 1.9	982.3 ± 23.3
H11	107.2 ± 2.7	241.2 ± 8.3	14.1 ± 1.0	601.1 ± 36.2
H12	522.6 ± 14.8	1402.3 ± 49.4	105.6 ± 3.8	3519.8 ± 163.0
H13	516.5 ± 12.7	1677.0 ± 58.9	73.0 ± 9.4	3306.7 ± 208.6
H14	261.8 ± 8.0	765.6 ± 37.4	46.9 ± 3.4	1681.4 ± 63.8

Results are the averages of 3 independent experiments ± SE.

S. aureus has a high degree of pathogenicity and is responsible for a wide range of diseases. It causes food poisoning by releasing enterotoxins into food and can produce toxic shock syndrome by releasing superantigens into the blood stream (Howe and others 1996; Kanafani and Fowler 2006). The antimicrobial action of honey against *S. aureus* has been well documented (Miorin and others 2003; Mundo and others 2004; Estrada and others 2005; Vorlova and others 2005; Patton and others 2006; Basson and Grobler 2008; Al-Naama 2009); however, there are contradictory reports on *B. cereus* susceptibility to honey. Some researchers have indicated marked microorganism sensitivity and others have ascribed their results to a certain degree of resistance (Mundo and others 2004; Patton and others 2006). In our study, *B. cereus* was the most sensitive microorganism to the Mexican honeys tested.

Antimicrobial activity of honey against *L. monocytogenes* and *S. Typhimurium* has been observed, usually at high concentrations (50% to 100%, w/v). In some cases, *L. monocytogenes* showed a marked resistance to honey (Estrada and others 2005). The fact that a steady stationary phase was not obtained for *S. Typhimurium* in the case of honeys H1, H4, H5, H8, and H11, could be attributed to the depletion of compounds with antimicrobial activity in honey by bacterial action allowing the further development of some stressed and surviving microorganisms.

Several studies have used well or disc diffusion assays to determine antimicrobial activity of honeys. These assays show low sensitivity and the concentration of honey at which the antimicrobial activity has been reported varies from 25% to 100% (w/v) (Estrada and others 2005; Mundo and others 2004; Patton and others 2006; Mercan and others 2007). In the well diffusion assay, slow growth of pathogens in a defined area was observed, probably due to osmotic effect. In our research, the antimicrobial activities of honeys were evaluated in suspensions at concentration of 10% (w/v) in TSB and the inhibition of the microorganism was clearly observed. Turbidity measurements were used by McMeekin and others (1993) and Augusti and others (1999) to estimate the growth parameters of bacteria as an alternative to traditional plate counts.

A regression study was performed, using a stepwise variable selection technique, to identify significant effects of quality param-

eters and phenolic compound content on antioxidant properties. Results in the form of regression equations are shown below:

$$\widehat{ABTS} = 408.38 + 1.11 P + 1.38 TP$$

$$(p = 0.04)(p = 0.01)$$

$$R^2 = 0.70$$

$$\widehat{DPPH} = 224.42 - 9.89 M + 0.13 P - 6.81 L^* + 2.02 a^* + 48.96 pH$$

$$(p = 0.01)(p = 0.00)(p = 0.00)(p = 0.05)(p = 0.00)$$

$$R^2 = 0.96$$

$$\widehat{FRAP} = 224.42 + 1.47 P - 70.41 L^* + 89.99 a^*$$

$$(p = 0.01)(p = 0.01)(p = 0.00)$$

$$R^2 = 0.83$$

M = moisture, P = proline, L^* = lightness, a^* = red-green coordinate, TP = total phenolic content.

Proline and total phenolic content had a positive effect on the antioxidant capacity values obtained by the ABTS assay. For DPPH assay, proline, red-green coordinate, and pH had a positive effect, moisture, and lightness had a negative effect. In the case of FRAP assay, proline, and red-green coordinate had positive effect and lightness negative effect.

Positive correlation between proline and antioxidant activity was previously observed in honey from Burkina Fasan (Meda and others 2005). The correlations between antioxidant activity and color would also be expected because the color of honey partly reflects the content of the pigments with antioxidant properties (Bertoncelj and others 2011).

The proline and phenolic compounds appear to be responsible for antioxidant activity of the analyzed honey; this has been confirmed by other studies (Beretta and others 2005; Meda and others 2005; Vela and others 2007; Al and others 2009; Pichichero and others 2009).

For purposes of having a multivariate perspective, a descriptive scheme that includes the antioxidant and antimicrobial activities of the complete honeys was developed and it is shown in Figure 1. In

Table 5—Antimicrobial activity of 14 Mexican honeys investigated.

	Microorganism								
	<i>Listeria monocytogenes</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Salmonella Typhimurium</i>		
	rate (OD/h)	lag (h)	MPD (OD)	rate (OD/h)	lag (h)	MPD (OD)	rate (OD/h)	lag (h)	MPD (OD)
	Multifloral								
H1	0 ^a	>48 ^a	0.2 ^a	0.1 ± 0.0	13.1 ± 0.4	0.7 ± 0.0	0.1 ± 0.0	5.9 ± 0.5	0.7 ± 0.0 ^b
H2	0 ^a	>48 ^a	0.2 ^a	0.1 ± 0.0	14.6 ± 0.7	0.6 ± 0.0	0 ^a	>48 ^a	0.1 ^a
H3	0.2 ± 0.0	18.4 ± 0.5	0.6 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.2 ± 0.9	0.5 ± 0.0	0 ^a	>48 ^a	0.1 ^a
H4	0.0 ± 0.0	12.0 ± 0.5	0.5 ± 0.1	0 ^a	>48 ^a	0.4 ^a	0.1 ± 0.0	5.5 ± 0.5	0.7 ± 0.0 ^b
H5	0 ^a	>48 ^a	0.2 ^a	0.1 ± 0.0	12.6 ± 0.4	0.6 ± 0.0	0.1 ± 0.0	7.3 ± 0.4	0.5 ± 0.0 ^b
	Monofloral								
H6	0 ^a	>48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	>48 ^a	0.3 ^a	0 ^a	>48 ^a	0.2 ^a
H7	0.3 ± 0.2	18.6 ± 2.1	0.5 ± 0.0	0.1 ± 0.0	14.1 ± 0.6	0.7 ± 0.0	0 ^a	>48 ^a	0.2 ^a
H8	0.2 ± 0.1	19.6 ± 1.2	0.5 ± 0.0	0.0 ± 0.0	8.8 ± 0.3	0.8 ± 0.0	0.0 ± 0.0	4.0 ± 1.4	0.7 ± 0.0 ^b
H9	0 ^a	>48 ^a	0.1 ^a	0 ^a	>48 ^a	0.3 ^a	0 ^a	>48 ^a	0.2 ^a
H10	0 ^a	>48 ^a	0.2 ^a	0 ^a	>48 ^a	0.3 ^a	0 ^a	>48 ^a	0.1 ^a
H11	0 ^a	>48 ^a	0.2 ^a	0.1 ± 0.0	11.2 ± 0.4	0.7 ± 0.0	0.1 ± 0.0	6.2 ± 0.5	0.7 ± 0.0 ^b
H12	0 ^a	>48 ^a	0.2 ^a	0 ^a	>48 ^a	0.2 ^a	0.1 ± 0.0	9.6 ± 0.4	0.5 ± 0.0
H13	0.2 ± 0.1	19.1 ± 2.1	0.5 ± 0.0	0.1 ± 0.0	10.7 ± 0.3	0.6 ± 0.0	0.1 ± 0.0	7.0 ± 0.3	0.6 ± 0.0
H14	0 ^a	>48 ^a	0.16 ^a	0 ^a	>48 ^a	0.2 ^a	0 ^a	>48 ^a	0.2 ^a

Results are the averages of 3 independent experiments ± SD.

OD = optical density.

MPD = maximum population density.

^aNo growth.

^bA steady stationary phase was not obtained.

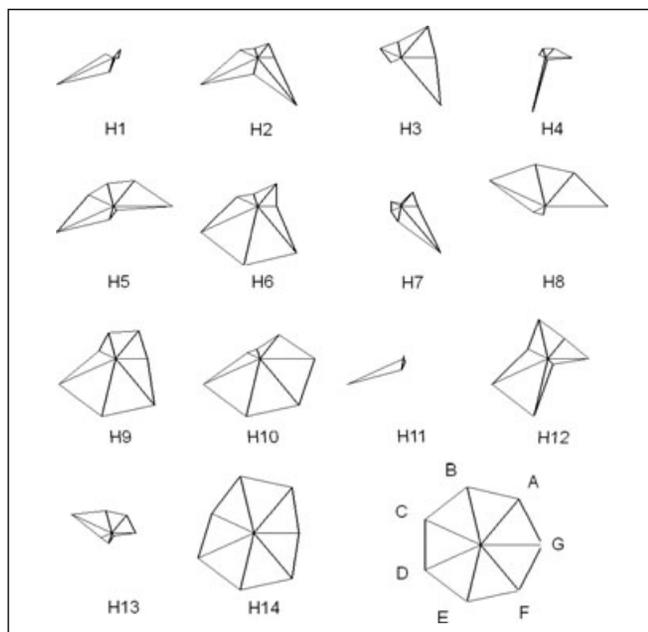


Figure 1—Representative schemes of antioxidant and antimicrobial profiles in 14 sample honeys. A = mg GA/kg, total phenols; B = μmol Trolox/kg, ABTS assay; C = μmol Trolox/kg, DPPH assay; D = μmol FeSO₄/kg, FRAP assay; E = *Listeria monocytogenes* lag phase, F = *Staphylococcus aureus* lag phase, G = *Salmonella Typhimurium* lag phase.

a star, the length of each ratio-like line represents the relative value with respect to the observed maximum of a measured parameter. For example, line “A” represents the total phenolic content and it is the largest one for sample H8 and the smallest one for sample H11. It means that samples H8 and H11 showed the highest and the lowest total phenol contents, respectively. From this scheme it can be noticed that there are clear differences among the studied honeys. Sample H14 (eucalyptus flower) has the most interesting profile because it is a very biologically active honey, followed by H9 (orange blossom) and H10 (bell flower). Honey H6 (bell flower) demonstrated low antioxidant activity but very good antimicrobial activity, inhibiting the growth of all 4 evaluated microorganism. While honey sample H8 (orange blossom) showed good antioxidant activity, and no antimicrobial effects, honey samples H12 (eucalyptus flower), H5 (multifloral), and H2 (multifloral) demonstrated moderate antioxidant activity and somewhat of an important antimicrobial effect. Samples H1 (multifloral), H4 (multifloral), and H11 (cactus flower) are honeys displaying weak profiles of effects.

Conclusions

In this study, some multifloral and monofloral Mexican honeys are described with regard to their quality parameters and antioxidant and antimicrobial properties. High variability was found in the evaluated biological activities; however, the monofloral honey samples from orange blossoms and eucalyptus flowers demonstrated to be good sources of antioxidant and antimicrobial compounds deserving further studies. Mexican honeys are an important source of secondary metabolites with biological properties related to human health.

Acknowledgment

The authors thank the Natl. Council for Science and Technology (CONACYT) for a graduate fellowship, to author Beatriz A. Rodriguez.

References

- Al ML, Daniel D, Moise A, Bobis O, Laslo L, Bogdanov S. 2009. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chem* 122: 863–7.
- Al-Naama RT. 2009. Evaluation of *in vitro* inhibitory effect of honey on some bacterial isolates. *J Bacteriol Res* 1:64–7.
- Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Díaz D, Estevez Y, Romandini S, Giampieri F, Damiani E, Astolfi P, Bonpadre S, Battino M. 2010. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food Chem Toxicol* 48:2490–9.
- AOAC. 2000. Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16th ed. Washington, D.C.: AOAC. 44:23–4.
- Augusti JC, Rosso L, Carlier V. 1999. Estimation of temperature-dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *J Microbiol Methods* 38:137–46.
- Baltrusaitytė V, Venskutonis PR, Ceksteryte V. 2007. Radical scavenging activity of different floral origin honey and bee bread phenolic extracts. *Food Chem* 101:502–14.
- Baranyi J, Roberts TA. 1994. A dynamic approach to predicting the bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol* 23:277–94.
- Baroni MV, Arrua C, Nores ML, Faype P, Díaz MP, Chiabrando GA, Wunderlin DA. 2009. Composition of honey from Córdoba (Argentina): assessment of North/South provenance by chemometrics. *Food Chem* 114:727–33.
- Basson N, Grobler SR. 2008. Antimicrobial activity of two South African honeys produced from indigenous *Leucospermum cordifolium* and *Erica* species on selected micro-organisms. *BMC Complement Altern Med* 8:41–4.
- Beretta G, Granata P, Ferrero M, Orioli M, Facino RM. 2005. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal Chim Act* 553:185–91.
- Bertoncelj J, Dobersek U, Jamnik M, Golob T. 2007. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem* 105:822–8.
- Bertoncelj J, Golob R, Kropf U, Korošec M. 2011. Characterisation of Slovenian honeys on the basis of sensory and physicochemical analysis with a chemometric approach. *Int J Food Sci Tech* 46:1661–71.
- Bogdanov S, Ruoff K, Persano O. 2004. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie* 35:54–17.
- CA. 2001. Codex Alimentarius Commission: Codex standard 12, revised Codex standard for honey standards and standard methods, Vol. 11. *Sperimentale per la Zoologia*, Rome. Available from: <http://www.codexalimentarius.net/>. Accessed Jan 10, 2011.
- Estrada H, Gamboa MM, Chaves C, Arias ML. 2005. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. Evaluación de su carga microbiológica. *Arch Latin Nutr* 55:167–71.
- Ferreira ICFR, Aires E, Barreira JCM, Estevinho LM. 2009. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chem* 114:1438–43.
- 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 voltammetry. *Biochem Biophys Acta* 1721:174–84.
- Gheldorf N, Wang X, Engeseth NJ. 2002. Identification and quantification of antioxidant components of honey from various floral sources. *J Agric Food Chem* 50:5870–7.
- Gidamis AB, Chove BE, Shayo NB, Nnko SA, Bangu NT. 2004. Quality evaluation of honey harvested from selected areas in Tanzania with special emphasis on hydroxymethyl furfural (HMF) levels. *Plant Foods Hum Nutr* 59:129–32.
- Gomes S, Dias LG, Moreira LL, Rodrigues P, Estevinho L. 2010. Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honey from Portugal. *Food Chem Toxicol* 48:544–8.
- González-Miret ML, Terrab A, Hernanz D, Fernández Recamales MA, Heredia FJ. 2005. Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and their botanical origin. *J Agric Food Chem* 53:2574–80.
- Guerrini A, Bruni R, Poli F, Paganetto G, Muzzoli M, Scalvenzi L, Sacchetti G. 2009. Ecuadorian stingless bee (*Meliponinae*) honey: a chemical and functional profile of an ancient health product. *Food Chem* 114:1413–20.
- Howe RA, Brown NM, Spencer RC. 1996. The new threats of Gram positive pathogens: re-emergence of things past. *J Clin Pathol* 49:444–9.
- Juszcak L, Socha R, Roznowski J, Fortuna R, Nalepka K. 2009. Physicochemical properties and quality parameters of herb honeys. *Food Chem* 110: 538–42.
- Kanafani ZA, Fowler VG. 2006. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24:182–93.
- Loarca-Piña G, Mendoza S, Ramos-Gómez M, Reynoso R. 2010. Antioxidant, antimutagenic, and antidiabetic activities of edible leaves from *Cnidioscolus chayamansa* Mc. Vaugh. *J Food Sci* 75:68–72.
- McMeekin TA, Olley JN, Ross T, Ratkowsky DA. 1993. Optical density methods: predictive microbiology. United Kingdom, Wiley, Chichester. 31–4 p.
- Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem* 91:571–7.
- Mercan N, Guvensen A, Celik A, Katircioglu H. 2007. Antimicrobial activity and pollen composition of honey samples collected from different provinces in Turkey. *Nat Prod Res* 21:187–95.
- Miorin PL, Levy-Junior NC, Custodio AR, Bretz WA, Marcucci MC. 2003. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol* 95:913–20.
- Mundo MA, Padilla-Zakour OI, Worobo RW. 2004. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *Int J Food Microbiol* 97:1–8.
- Nanda V, Sarkar BC, Sharma HK, Bawa AS. 2003. Physico-chemical properties and estimation of mineral content in honey produced from different plants in Northern India. *J Food Compos Anal* 16:613–9.
- Nanda V, Singh B, Krukeja VK, Bawa AS. 2009. Characterisation of honey produced from different fruit plants of northern India. *Int J Food Sci Technol* 44:2629–36.

- Olasupo NA, Fitzgerald DJ, Gasson MJ, Narbad A. 2003. Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enteric serovar Typhimurium*. *Let App Microbiol* 36:448–51.
- Patton T, Barret J, Brennan J, Moran N. 2006. Use of spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. *J Microbiol Methods* 64:84–95.
- Pérez E, Rodríguez-Malaver AJ, Vit P. 2006. Antioxidant capacity of Venezuelan honey in Wistar rat homogenates. *J Med Food* 9:510–6.
- Persano L, Bogdanov S. 2004. Determination of honey botanical origin: problems and issues. *Apidologie* 35:S2–3.
- Pichichero E, Canuti L, Canini A. 2009. Characterization of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin. *J Sci Food Agric* 89:609–16.
- Piljac-Žegarac L, Stipčević T, Belščak A. 2009. Antioxidant properties and phenolic content of different floral origin honeys. *J ApiProd ApiMed Sci* 1:43–50.
- Shamala TR, Jyothi YPS, Saibaba P. 2002. Antibacterial effect of honey on the *in vitro* and *in vivo* growth of *Escherichia coli*. *World J Microbiol Biotechnol* 18:863–5.
- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat Res* 579:200–13.
- Taormina PJ, Niemira BA, Beuchat LR. 2001. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int J Food Microbiol* 69:217–25.
- Vela L, de Lorenzo C, Pérez RA. 2007. Antioxidant capacity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and other physicochemical properties. *J Sci Food Agric* 87:1069–75.
- Viuada-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Zaldivar-Cruz JM, Kuri V, Fernández-López J, Carbonell-Barrachina AA, Pérez-Álvarez JA. 2010. Aroma profile and physico-chemical properties of artisanal honey from Tabasco, Mexico. *Int J Food Sci Technol* 45:1111–8.
- Vorlova L, Karpiskova R, Chabiniokova I, Kalabova K, Brazdova A. 2005. The antimicrobial activity of honeys produced in the Czech Republic. *Czech J Anim Sci* 50:376–84.
- Zalibera M, Stasko A, Slebodová A, Jancovicová V, Cermáková T, Brezová V. 2008. Antioxidant and radical-scavenging activities of Slovak honeys: an electron paramagnetic resonance study. *Food Chem* 110:512–21.