

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***RELACIÓN ENTRE LA PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE
HIDRÓGENO EN MIEL Y SU CONTENIDO DE FLAVONOLES,
FLAVONAS Y CATIONES DE HIERRO Y COBRE.***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Química área de Especialización en Química Analítica y
Memoria para optar al Título de Químico por:

Javiera Francisca Sanhueza Martínez

Director de Tesis: Dr. Edwar Fuentes Pérez

Santiago-CHILE

Marzo 2024

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata:

JAVIERA FRANCISCA SANHUEZA MARTÍNEZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química y Título de Químico.

Director de Tesis:

Dr. Edwar Fuentes Pérez

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. María Carolina Zúñiga López

Dr. Waldo Quiroz Venegas

MSc. Nalda Romero Palacios

*“Pon tu corazón, mente, intelecto y alma incluso en tus actos más pequeños.
Ese es el secreto del éxito.”*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi familia, principalmente a mi Mamá y mi tía Xime, quienes han contribuido de diversas formas a quien soy hoy y muchas veces sin saberlo me animaron. A mi hermana Renata, quien siendo pequeña me ha demostrado las distintas perspectivas de la vida y me ha hecho inmensamente feliz desde que llegó. A mi Lela y a mi Tata, a quienes les debo la mayor parte de mis enseñanzas y recuerdos de infancia, lamentablemente no están hoy aquí, pero esto es para ustedes.

A mis amigas de la universidad, Natu, Cata, MPaz y Tami, gracias por todos los momentos vividos tanto dentro como fuera de la universidad, por hacer que valiera la pena quedarnos estudiando hasta que el tío Julio nos echara de la biblioteca, por celebrar nuestros triunfos cada viernes o también, pasar las penas cuando nos iba mal. Cote y Paty, sin duda han sido uno de los apoyos y amistades más lindas e inesperadas dentro de la U, gracias por siempre escucharme, por los estudios días enteros por zoom en pandemia y por acompañarme siempre en todo el trayecto del magister. A mis amigos Giovanni y Ernesto, porque si bien nos hicimos amigos en los últimos años, su apañe desde que existen en mi vida es algo que agradezco demasiado.

A mi equipo de volei, en especial a la Feña, quien me acompaña desde el 2016 y me enseñó que la distancia nunca es un impedimento para nada, de verdad gracias por tanto, por los consejos, las correcciones y los momentos vividos fuera y dentro de la cancha, nunca olvidaré los JOE 2018. A la Ángela, gracias por ser tan chistosa y tan buena amiga, por hacer que los días de frustración en el lab desaparecieran porque sabía que me iba a reír contigo durante el entrenamiento.

A la Nayla, la Peca, el Feña y la Mary por aportar su granito de arena constantemente y por creer siempre en mí, son los mejores amigos que pueden existir, de verdad estaré infinitamente agradecida siempre por todo lo que han hecho por mí.

A mi pololo, Sebita, muchas gracias por estar dispuesto a sacarme carcajadas en todo momento, por tu serenidad, por tu cariño, por tu apoyo y acompañarme en este proceso.

A mi director de tesis, profe Edwar, gracias por abrirme las puertas del laboratorio y siempre ayudarme, su inteligencia y entusiasmo desde el día uno que lo conozco por la ciencia realmente es algo que agradezco mucho.

También cómo no agradecerle al Iván, quien me enseñó y me orientó en muchas oportunidades dentro del laboratorio, gracias por tu disposición y tu buena onda siempre.

A la Sra. Anita y a Don Marcelo, quienes día a día se preocupaban por saber cómo estaba y por estar siempre dispuestos a ayudar.

A todas las personas que no alcance a nombrar detalladamente, pero que fueron importantes en este proceso, muchas gracias por hacer de esta etapa una de las mejores de mi vida.

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo de tesis ha sido financiado por: Proyecto FONDECYT REGULAR N°1190217.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio Química Analítica de Contaminantes Orgánicos y Elementos Traza de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

EXPOSICIÓN DE RESULTADOS

- **48th Apimondia International Apicultural Congress, Santiago, Chile, Septiembre 2023:** Póster “Hydrogen Peroxide production on simulated honey induced by different flavonoids in the presence of Cu(II)”.
- **Jornadas de Investigación, Postgrado y Educación Continua, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Octubre 2023:** Póster “Hydrogen Peroxide production on simulated honey induced by different flavonoids in the presence of Cu(II)”.
- **XXXIV Jornadas Chilenas de Química, Puerto Varas, Enero 2024:** Presentación oral “Relación entre la producción de peróxido de hidrógeno en miel y su contenido de flavonoles, flavonas y cationes de hierro y cobre”.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Las abejas y sus productos	1
1.2	La miel y su composición	2
1.3	Propiedades de la miel	8
1.4	Acción prooxidante de los flavonoides	9
2	HIPÓTESIS	16
3	OBJETIVO GENERAL	16
4	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
5	MATERIALES	17
5.1	Reactivos	17
5.2	Solventes	18
5.3	Equipos	18
5.4	Software	19
5.5	Muestras	19
6	MÉTODOS	21
6.1	Determinar el contenido de flavonoles (quercetina, kaempferol y miricetina) y flavonas (crisina y apigenina) en mieles de la zona centro-sur de Chile	21
6.1.1	Extracción de flavonoles y flavonas en muestras de miel (Obtención de extractos concentrados y agotados en flavonoides)	21
6.1.2	Curva de calibración y cuantificación de flavonoles y flavonas mediante HPLD-DAD	22
6.1.3	Validación	23
6.2	Cuantificar el contenido de metales (hierro y cobre) en muestras de miel de la zona centro-sur de Chile	24
6.3	Evaluar el efecto de la dilución de la miel, presencia de Fe(III), Cu(II), quelantes metálicos y acción de proteinasa K sobre la generación de H ₂ O ₂	25
6.3.1	Determinación de H ₂ O ₂	25

6.3.2	Efecto de la dilución de la miel	26
6.3.3	Efecto de Fe(III), Cu(II), quelantes metálicos y acción de proteinasa K en muestras de miel	27
6.4	Evaluar la generación de peróxido de hidrógeno por autooxidación de los flavonoles y flavonas en medio de miel sintética en ausencia y presencia de Fe(III) y Cu(II)	28
6.4.1	Preparación miel sintética	28
6.4.2	Diseño experimental	28
6.4.3	Comparación de la producción de H ₂ O ₂ en mieles reales y sintéticas	29
6.5	Evaluar la generación de peróxido de hidrógeno en extractos de miel concentrados y agotados en flavonoles y flavonas en ausencia y presencia de Fe(III)	30
6.5.1	Extracto concentrado (EC)	30
6.5.2	Extracto agotado (EA)	30
6.5.3	Extracto agotado deproteinizado (EAD)	30
6.6	Análisis estadístico	31
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
7.1	Determinar el contenido de los flavonoles (quercetina, kaempferol y miricetina) y flavonas (crisina y apigenina) en mieles de la zona centro-sur de Chile	32
7.1.1	Curva de calibración	32
7.1.2	Cifras de mérito	35
7.1.3	Contenido de flavonoles y flavonas en muestras de miel	36
7.2	Cuantificar el contenido de metales (hierro y cobre) en muestras de miel de la zona centro-sur de Chile	40
7.3	Evaluar el efecto de la dilución, presencia de Fe(III), Cu(II), quelantes metálicos y acción de proteinasa K sobre la generación de H ₂ O ₂ en mieles de la zona centro-sur de Chile	42
7.3.1	Efecto de la dilución sobre la generación de H ₂ O ₂	42

7.3.2	Relación multifactorial entre los flavonoides, hierro y cobre de la miel y su generación de H ₂ O ₂	46
7.3.3	Efecto de Fe(III), Cu(II), quelantes metálicos y acción de proteínasa K sobre la generación de H ₂ O ₂	49
7.4	Evaluar la generación de peróxido de hidrógeno por autooxidación de los flavonoles y flavonas en medio de miel sintética en ausencia y presencia de Fe(III) y Cu(II)	52
7.4.1	Generación de H ₂ O ₂ por crisina y apigenina en presencia de Fe(III) y Cu(II)	53
7.4.2	Generación de H ₂ O ₂ por kaempferol, quercetina y miricetina en presencia de Fe(III) y Cu(II)	58
7.4.3	Comparación de la generación de H ₂ O ₂ por los distintos flavonoides estudiados	63
7.4.4	Comparación de la generación de H ₂ O ₂ en mieles sintéticas y reales	66
7.5	Evaluar la generación de peróxido de hidrógeno en extractos de miel concentrados y agotados en flavonoles y flavonas en ausencia y presencia de Fe(III)	68
7.5.1	Generación de H ₂ O ₂ en extractos concentrados y agotados	68
7.5.2	Generación de H ₂ O ₂ en extractos concentrados y agotados en presencia de Fe(III)	69
7.5.3	Comparación de producción de H ₂ O ₂ en miel cruda, extractos y miel sintética	72
8	CONCLUSIONES	74
9	BIBLIOGRAFÍA	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de los azúcares comúnmente encontrados en la miel. _____	4
Figura 2. Composición de la miel indicando los porcentajes de varios azúcares, agua y de otros constituyentes (Kolayli y col., 2012). _____	5
Figura 3. Oxidación de glucosa a ácido glucónico y formación de peróxido de hidrógeno (Brudzynsky, 2020). _____	6
Figura 4. Estructura básica flavonoides y sus derivados (Chávez-González y col., 2020). _____	10
Figura 5. A y B) Eliminación del radical libre (R·) por flavonoides (FI-OH) mediante donación directa de átomos de hidrógeno (acción antioxidante). C y D) Generación de anión superóxido y peróxido de hidrógeno por autooxidación del radical flavonoide fenoxilo (FI-O·) y oxidación del compuesto original por anión superóxido (acción prooxidante), respectivamente. E) Reacción de Fenton ($M^n = Fe^{2+}$) o tipo Fenton ($M^n = Cu^{1+}; Mn^{2+}$) que produce radical hidroxilo. _____	12
Figura 6. Criterios estructurales en los flavonoides que favorecen la unión de los metales de transición y la doble acción antioxidante/prooxidante: Una estructura o-dihidroxi en el anillo B, un doble enlace de 2,3 en conjugación con un grupo 4-oxo en el anillo en el anillo C y grupos 3- y 5-OH con un grupo 4-oxo en los anillos A y C, respectivamente. _____	13
Figura 7. Mecanismo de reacción de flavonoides actuando como agentes prooxidantes con producción de ROS en presencia de Cu^{2+} . El Cu^{2+} oxida el flavonoide a una semiquinona que luego es oxidada por O_2 a quinona con producción de radical superóxido. Este, luego puede generar peróxido de hidrógeno, el que por una reacción tipo Fenton con Cu^{1+} produce el radical hidroxilo que provoca daño en el ADN bacteriano (Sakihama y col., 2002). _____	14
Figura 8. Esquema de reacción entre ODN y H_2O_2 catalizada por la enzima peroxidasa. _____	25
Figura 9. Cromatograma HPLC-DAD de estándares a 260 y 360 nm. Miricetina (Mi), Quercetina (Qc), Apigenina (Ap), Kaempferol (Ka), Crisina (Cri). _____	33
Figura 10. Espectros de absorción de los estándares A) Miricetina, B) Quercetina, C) Apigenina, D) Kaempferol, E) Crisina. _____	34
Figura 11. Cromatograma HPLC-DAD muestra M28-RM. _____	38

Figura 12. Contenido flavonoides totales en mieles reales diluidas al 20% p/v obtenidos de la suma de los flavonoides detectados por HPLC-DAD. _____	40
Figura 13. Contenido de (A) hierro y (B) cobre (μM en solución de miel al 20% p/v) en muestras de miel chilenas. _____	41
Figura 14. Producción de H_2O_2 a distintas diluciones (% p/v) en mieles con (A) mayor producción de ROS, (B) producción intermedia, (C) producción baja. _____	43
Figura 15. Relación entre la generación de peróxido de hidrógeno y la concentración total de los flavonoides evaluados en la miel diluida al 20% p/v. _____	45
Figura 16. Coeficientes de regresión PLS para el modelo multivariable que describe la generación de H_2O_2 en mieles reales. _____	47
Figura 17. A) Complejación entre Fe^{3+} y kaempferol y posterior reacción redox intramolecular y B) Mecanismo de la actividad prooxidante con la generación de ROS. _____	48
Figura 18. A) Sitios de complejación entre Cu^{2+} y quercetina para actuar como antioxidante y B) mecanismo de actividad antioxidante. _____	49
Figura 19. Producción de H_2O_2 en mieles reales al 20% p/v en presencia de Fe(III) 50 μM , Cu(II) 30 μM , EDTA 200 μM y proteinasa K 1,5 U/mL; con (A) mayor producción de ROS, (B) producción intermedia y (C) producción baja. _____	50
Figura 20. Estructura química flavonas y flavonoles determinados en el presente estudio en mieles chilenas. _____	53
Figura 21. Producción de H_2O_2 en presencia de crisina a distintas concentraciones de (A) Fe(III), (B) Cu(II), (C) crisina-Fe y (D) crisina-Cu. _____	55
Figura 22. Producción de H_2O_2 en presencia de apigenina a distintas concentraciones de (A) Fe(III) y (B) Cu(II). _____	56
Figura 23. Producción de H_2O_2 en presencia de kaempferol a distintas concentraciones de (A) Fe(III), (B) Cu(II), (C) kaempferol-Fe y (D) kaempferol-Cu. _____	59
Figura 24. Producción de H_2O_2 en presencia de quercetina a distintas concentraciones de (A) Fe(III) y (B) Cu(II). _____	61
Figura 25. Producción de H_2O_2 en presencia de miricetina a distintas concentraciones de (A) Fe(III) y (B) Cu(II). _____	62
Figura 26. Producción de H_2O_2 en presencia de flavonoides a 200 μM (A) sin metal, (B) con hierro 50 μM y (C) con cobre 30 μM . _____	64

Figura 27. Comparación de la generación de H ₂ O ₂ en extracto concentrado (EC) y agotado (EA) en flavonoides. _____	68
Figura 28. Comparación de la generación de H ₂ O ₂ en EC y EC en presencia de Fe(III). _____	70
Figura 29. Comparación de la generación de H ₂ O ₂ en EA y EA en presencia de Fe(III). _____	71
Figura 30. Producción de H ₂ O ₂ en MC: miel cruda, EC: extracto concentrado, EA: extracto agotado, EAD: extracto agotado deproteinizado, MS: miel sintética (con una concentración total de flavonoides 10 veces la de las mieles reales correspondientes) y F _T : flavonoides totales) para A) M13-VI B) M27-V y C) M16-VI. _____	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructuras y propiedades de los cinco flavonoides considerados en el presente estudio. _____	11
Tabla 2. Muestras de miel estudiadas según codificación, origen botánico, año de recolección y región. _____	20
Tabla 3. Concentraciones de flavonoide agregadas a M28-RM en $\mu\text{g/g}$ de miel para la validación. _____	24
Tabla 4. Alícuotas de calibrador y reactivos para la curva de calibrado. ____	26
Tabla 5. Diseño experimental para mieles sintéticas al 20% p/v con flavonoide, Fe(III) y Cu(II). _____	29
Tabla 6. Tiempos de retención y longitudes de onda máximas para los analitos de estudio. _____	32
Tabla 7. Cifras de mérito para la validación de la metodología. Para LOQ se indica entre paréntesis el valor en μM para una miel al 20% p/v. _____	35
Tabla 8. Contenido de flavonoides específicos identificados en mieles reales. _____	37
Tabla 9. Contenido de flavonoides totales en mieles de distintos orígenes alrededor del mundo (F_T : flavonoides totales). _____	39
Tabla 10. Contenido de hierro y cobre en mieles de distintos orígenes alrededor del mundo. _____	42
Tabla 11. Análisis de varianza para la generación de H_2O_2 influenciada por flavonas, Fe^{3+} y Cu^{2+} . _____	54
Tabla 12. Regresión lineal crisina-Fe y crisina-Cu. _____	56
Tabla 13. Regresión lineal apigenina-Fe y apigenina-Cu. _____	57
Tabla 14. Análisis de varianza para la generación de H_2O_2 influenciada por flavonoles, Fe^{3+} y Cu^{2+} . _____	58
Tabla 15. Regresión lineal kaempferol-Fe y kaempferol-Cu. _____	60
Tabla 16. Regresión lineal quercetina-Fe y quercetina-Cu. _____	61
Tabla 17. Regresión lineal miricetina-Fe y miricetina-Cu. _____	63
Tabla 18. Constantes de formación entre flavonoles y Fe(III) a $\text{pH} = 4$. ____	66
Tabla 19. Generación de H_2O_2 μM en mieles sintéticas y reales al 20% p/v. 67	

ABREVIATURAS

5-HMF:	5-hidroximetilfurfural
GOx:	Glucosa oxidasa
ROS:	Especie reactiva de oxígeno
H₂O₂:	Peróxido de hidrógeno
MIC:	Concentración mínima inhibitoria
MBC:	Concentración bactericida mínima
SPE:	Extracción en fase sólida
EA:	Extracto agotado en flavonoides
EC:	Extracto concentrado en flavonoides
LOD:	Límite de detección
LOQ:	Límite de cuantificación
ODN:	O-dianisidina
ANOVA:	Análisis de varianza
PLS:	Mínimos cuadrados parciales
Mi:	Miricetina
Qc:	Quercetina
Ap:	Apigenina
Ka:	Kaempferol
Cri:	Crisina

RESUMEN

La especie de abeja *Apis mellifera*, desempeña un papel crucial en la polinización y en la producción de miel, un valioso producto que es utilizado tanto como alimento con propiedades nutricionales como con fines medicinales desde tiempos antiguos. En el contexto actual de resistencia bacteriana a los antibióticos, la miel ha surgido como una alternativa antimicrobiana prometedora. La actividad antibacteriana de la miel, atribuida en gran medida a la producción de peróxido de hidrógeno, se encuentra en constante investigación, especialmente en lo que respecta a la contribución de flavonoides a través de una vía no enzimática; la que sería modulada por la presencia de cationes metálicos como Fe(III) y Cu(II).

En el presente trabajo se estudiaron 15 mieles chilenas de distinta procedencia entre la IV y X región. En primer término, se determinaron en estas mieles las concentraciones de flavonoides (crisina, apigenina, kaempferol, quercetina y miricetina), hierro y cobre; por ser considerados como factores involucrados en la generación de peróxido de hidrógeno. Posteriormente se evaluó el efecto de la dilución de la miel sobre la generación de H₂O₂, estableciendo que la dilución óptima fue del 20% p/v. Se observó una correlación significativa entre la generación de peróxido de hidrógeno y la concentración total de los flavonoides en la miel, con una relación molar aproximada de 100:1. Adicionalmente, mediante un modelo de regresión multifactorial, se corroboró la relevancia de kaempferol, crisina y hierro sobre la generación de H₂O₂ en las mieles. En mieles diluidas al 20% p/v se evaluó entonces el efecto de la adición de Fe(III), Cu(II), EDTA y proteinasa K; donde el principal resultado fue la disminución de la generación de H₂O₂ en mieles de mayor producción con presencia de Fe(III) adicional; atribuible a su transformación en una reacción Fenton con

Fe(II), formado por la reducción de Fe(III) por parte de los flavonoides de la miel; a la formación de complejos con capacidad antioxidante y/o a la inhibición parcial de la enzima glucosa oxidasa. A continuación, como un modelo simplificado de estudio y comparación con las mieles reales, se evaluó la generación de H_2O_2 en miel sintética conteniendo los cinco flavonoides determinados; observando su producción por autooxidación de todos los flavonoides, particularmente de las flavonas, y un aumento significativo de la producción por parte de los flavonoles en presencia de Fe(III) y Cu(II); demostrando así el efecto catalizador de estos cationes en la autooxidación de los flavonoides. Además, la producción de H_2O_2 en mieles sintéticas fue alrededor de 300 veces menor que en las correspondientes mieles reales.

Finalmente, se realizó un estudio de la generación de H_2O_2 en extractos de miel concentrados y agotados en flavonoides; observando, a diferencia de lo esperado, que los extractos agotados generaron 5 veces más H_2O_2 que los concentrados, lo que sugiere una participación relevante de la enzima glucosa oxidasa en la producción de peróxido de hidrógeno de la miel. Además, en presencia de Fe(III), los extractos concentrados y agotados presentaron un comportamiento similar a la miel sintética y real, con incremento y disminución de la generación de H_2O_2 , respectivamente.

Los resultados obtenidos indican una participación dual de la GOx y los flavonoides en la generación de H_2O_2 en la miel, con la modulación de Fe(III). En este sentido, hay un efecto sumatorio entre la acción de GOx y los flavonoides, mientras que estos últimos actúan de forma sinérgica en la matriz de la miel.

SUMMARY

The honey bee species *Apis mellifera* plays a crucial role in pollination and honey production, a valuable product used both as a nutritionally rich food and for medicinal purposes since ancient times. In the current context of bacterial resistance to antibiotics, honey has emerged as a promising antimicrobial alternative. The antibacterial activity of honey, largely attributed to hydrogen peroxide production, is under constant investigation, especially regarding the contribution of flavonoids through a non-enzymatic pathway, which would be modulated by the presence of metal cations such as Fe(III) and Cu(II).

In this study, 15 Chilean honeys from different areas between the IV and X regions were investigated. Firstly, concentrations of flavonoids (chrysin, apigenin, kaempferol, quercetin, and myricetin), iron, and copper were determined in these honeys, as they are considered factors involved in hydrogen peroxide generation. Subsequently, the effect of honey dilution on H₂O₂ generation was evaluated, establishing that the optimal dilution was 20% w/v. A significant correlation was observed between hydrogen peroxide generation and the total concentration of flavonoids in honey, with an approximate molar ratio of 100:1. Additionally, through a multifactorial regression model, the relevance of kaempferol, chrysin, and iron on H₂O₂ generation in honeys was confirmed. In honeys diluted at 20% w/v, the effect of adding Fe(III), Cu(II), EDTA, and proteinase K was then evaluated. The main result was the reduction in H₂O₂ generation in honeys with additional Fe(III), attributable to its transformation in a Fenton reaction with Fe(II), formed by the reduction of Fe(III) by honey flavonoids, the formation of complexes with antioxidant capacity, and/or partial inhibition of the glucose oxidase enzyme. Next, as a simplified model for study and comparison with real honeys, H₂O₂ generation

was evaluated in synthetic honey containing the five determined flavonoids, observing production through autooxidation of all flavonoids, particularly flavones, and a significant increase in production by flavonols in the presence of Fe(III) and Cu(II), demonstrating the catalytic effect of these cations on flavonoid autooxidation. Furthermore, H₂O₂ production in synthetic honeys was approximately 300 times lower than in corresponding real honeys.

Finally, a study of H₂O₂ generation was conducted in concentrated and depleted flavonoid honey extracts, observing, contrary to expectations, that depleted extracts generated 5 times more H₂O₂ than concentrated ones, suggesting a relevant involvement of glucose oxidase enzyme in honey hydrogen peroxide production. Additionally, in the presence of Fe(III), concentrated and depleted extracts showed a behavior similar to synthetic and real honey, with an increase and decrease in H₂O₂ generation, respectively.

The results obtained indicate a dual involvement of GOx and flavonoids in H₂O₂ generation in honey, modulated by Fe(III). In this regard, there is a cumulative effect between GOx and flavonoids, while the latter act synergistically in the honey matrix.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Las abejas y sus productos

Las abejas, uno de los grupos de insectos más abundantes y beneficiosos para los seres humanos, desempeñan un papel crucial en la polinización de plantas, tanto silvestres como cultivadas, al buscar néctar y polen en las flores. Con alrededor de 20.000 especies conocidas en todo el mundo (Daughenbaugh y col., 2021), las abejas, en particular *Apis mellifera*, también conocida como abeja occidental o europea, destaca por su importancia económica, agrícola y ambiental. (Han y col., 2012).

Estos insectos himenópteros viven en grupos sociales con una función fija y específica para cada individuo, dando como resultado una colonia que funciona hasta cierto punto, como un único organismo. Aunque las abejas sociales, como la *Apis mellifera*, han sido domesticadas para la producción de productos apícolas en cantidades significativas, existen también variedades salvajes y solitarias de himenópteros que generan productos en cantidades más modestas, las cuales son inutilizables para los humanos (Trhlin y col., 2011).

Durante la temporada de mayor disponibilidad de alimentos, las colonias se reproducen mediante enjambres. En el interior de las colmenas, coexisten tres castas: las obreras, los zánganos y la abeja reina. Las obreras, hembras infértiles y más numerosas, se encargan de la recolección de néctar. Los zánganos, machos de la colmena, tienen la función de fecundar a la reina durante los vuelos nupciales. Mientras tanto, la abeja reina, la única hembra fértil, pone huevos fecundados que se convierten en obreras y huevos no fecundados que originan zánganos. En este punto, es relevante mencionar que la organización jerárquica de las colonias, especialmente en la obtención y almacenamiento de

alimentos, puede llevar a que, en periodos de escasez, la colonia abandone su colmena y emigre a un área cercana con flores recién florecidas, reconstruyendo sus panales, un fenómeno conocido como fuga o migración, que se busca evitar en la apicultura (Crane, 2009).

La apicultura es la actividad dedicada a la crianza y cuidado de colonias de abejas sociales, actividad de la cual el apicultor obtiene una cosecha o recompensa. Desde la antigüedad los egipcios, romanos, chinos y persas han documentado los valores nutricionales y medicinales de los productos de las abejas, además de utilizarlos durante miles de años (Nader y col., 2021). Estos productos pueden ser: cera de abeja, polen, jalea real, pan de abeja, propóleo y miel (Bobiş y col., 2010).

En Chile, como en otras partes del mundo, la apicultura juega un rol relevante no solamente por la producción de miel y otros productos anteriormente mencionados, sino también por los servicios de polinización con abejas *A. Mellifera* que tienen un impacto positivo en el desarrollo de la agricultura, protección de la biodiversidad y de las comunidades rurales que desarrollan la actividad. Al año 2019, Chile ocupó la posición 29 entre los productores mundiales de miel, con 11,6 mil toneladas anuales, siendo el principal producto de la colmena que se destina al intercambio comercial (Iturra, 2021).

1.2 La miel y su composición

La miel se puede definir como un fluido dulce, viscoso y natural que es producido gracias a las abejas, quienes son capaces de recolectar el néctar de las flores y otras secreciones extra florales que luego son transportadas a los panales para finalmente, transformar lo recolectado en miel mediante digestiones enzimáticas combinándose con otros compuestos como proteínas y

aminoácidos que son aportados por estos insectos (White Jr., 1978). A menudo, la miel se clasifica según su origen en dos tipos: miel de flor y de mielada. La miel de flores procede principalmente del néctar de las flores, su color varía casi de incoloro a amarillo y pardo amarillento, mientras que la miel de mielada es la miel que proviene principalmente de las exudaciones de plantas o excreciones de insectos chupadores de savia (hemípteros), en donde estos perforan las células vegetales, ingieren la savia de la planta y luego la secretan nuevamente, su color varía entre pardo claro y casi negro. Entre las mieles florales, las más disponibles comercialmente son las mieles multiflorales, lo que significa que provienen de varias fuentes botánicas, ninguna de las cuales es predominante. Sin embargo, también es posible encontrar mieles monoflorales elaboradas principalmente a partir del néctar de un tipo de flor (contenido $\geq 45\%$) y reciben el nombre de esa planta (Bradbear, 2009).

Durante un largo tiempo de la historia humana la miel fue una fuente importante de carbohidratos y el único edulcorante disponible, hasta que la producción de azúcar de caña comenzó a desplazarla después del 1800. De manera general, se puede decir que la miel corresponde a una solución de azúcar sobresaturada con una composición mayoritariamente de fructosa y glucosa (Figura 1), aunque es mucho más que esto debido a la combinación única y variable de componentes que hace que la miel sea un valioso producto natural donde su composición, valor nutricional, apariencia y propiedades sensoriales difieren en relación a su origen botánico y el área geográfica donde las abejas se encuentren (Kolayli y col., 2012).

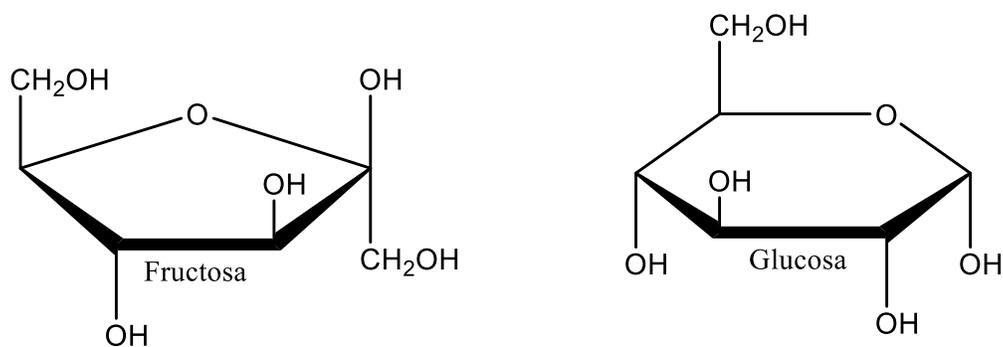


Figura 1. Estructura química de los azúcares comúnmente encontrados en la miel.

Tal como se observa en la Figura 2, la composición de la miel consta mayoritariamente de fructosa, glucosa y agua, en un porcentaje aproximado de 38%, 31% y 17%, respectivamente (Kolayli y col., 2012). Desde un punto de vista químico, la miel puede definirse como un alimento rico en azúcares y agua junto con constituyentes menores (3%) como minerales, vitaminas, aminoácidos, proteínas, ácidos orgánicos, flavonoides y otros compuestos fenólicos y sustancias aromáticas. Si bien la composición de la miel le otorga propiedades químicas únicas para su almacenamiento a largo plazo, igualmente puede sufrir cambios significativos según el tiempo y las condiciones en que estas se almacenen. Por lo general, se pueden producir algunas variaciones en la composición debido a diversos procesos químicos o bioquímicos, como la fermentación, oxidación o deshidratación de azúcares, lo que provoca cambios en el contenido ácido y la formación de productos de la reacción de Maillard como el 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), dando lugar a la modificación en las propiedades sensoriales y como consecuencia, una miel de menor calidad (Santos-Buelga & González-Paramás, 2017).

Composición de la miel

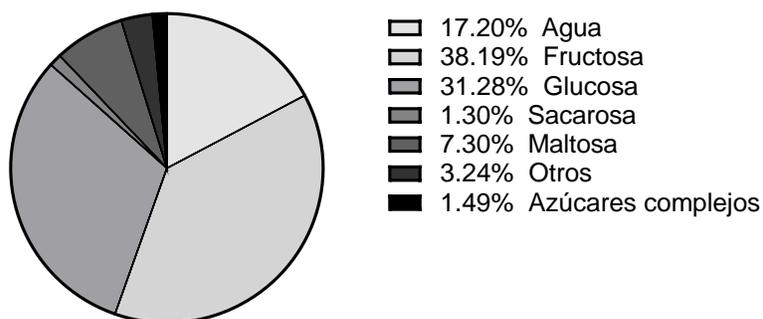


Figura 2. Composición de la miel indicando los porcentajes de varios azúcares, agua y de otros constituyentes (Kolayli y col., 2012).

De acuerdo con los constituyentes menores, los minerales dentro de la miel se pueden encontrar en un rango de 0,02% a 1,03%. El potasio, representa alrededor de un tercio del total de estos constituyentes, destacándose por ser el principal elemento mineral en comparación con la gran variedad de oligoelementos presentes (Bogdanov y col., 2007). Estos minerales, provienen principalmente del suelo y de las plantas productoras de néctar, aunque también pueden provenir de fuentes antropogénicas, como la contaminación ambiental. Dentro de las mieles, se han identificado macroelementos (Na, K, Ca, Mg, P, S, Cl), microelementos (Fe, I, Zn, Se, Cu, Mn, Cr, Mo, Co, Ni) y elementos traza (Al, As, Ba, Bi, B, Br, Cd, Pb, Rb, Sb, Sm, Sn, Sr, Tl, Ti) que variarán su concentración dependiendo del origen botánico de la miel, donde las mieles claras tienen un menor contenido de minerales que las mieles oscuras (Solayman y col., 2016).

Por otra parte, se pueden encontrar distintas vitaminas como la vitamina C y también del complejo vitamínico B, que derivan del polen en suspensión. Del complejo B se encuentra la tiamina (B1), riboflavina (B2), ácido nicotónico (B3), ácido pantoténico (B5), piridoxina (B6), biotina (B8, H) y ácido fólico

(B9), donde el pH ácido de la miel ayuda a la conservación de estas (Bonté & Desmoulière, 2013).

Por otra parte, los aminoácidos y proteínas de las mieles se pueden relacionar tanto a fuentes vegetales como animales, incluyendo los fluidos y las secreciones de néctar de las glándulas salivales de las abejas, donde para los aminoácidos la fuente principal es el polen y para proteínas, las abejas (Sak-Bosnar & Sakač, 2012; Cebrero y col., 2020). De los aminoácidos, se ha reportado que la prolina es el aminoácido encontrado en mayor cantidad en mieles con alrededor de un 66% del total de los aminoácidos libres. La presencia de prolina junto con otros componentes como sacáridos y glucosa oxidasa son utilizados como indicador de madurez y de adulteración de la miel (Wang & Li, 2011). Por otra parte, dentro de las proteínas, se encuentra la defensina-1 que contribuye a la actividad bactericida de la miel (Kwakman y col., 2010) y la enzima glucosa oxidasa (GOx), que mediante una serie de reacciones de óxido-reducción en conjunto con un cofactor responsable de la actividad redox de la enzima (cofactor FAD) y presencia de oxígeno, convierte la glucosa en ácido glucónico y como consecuencia, ocurre la generación de peróxido de hidrógeno (Moreira y col., 2007; Brudzynsky, 2020), tal como se muestra en la Figura 3.

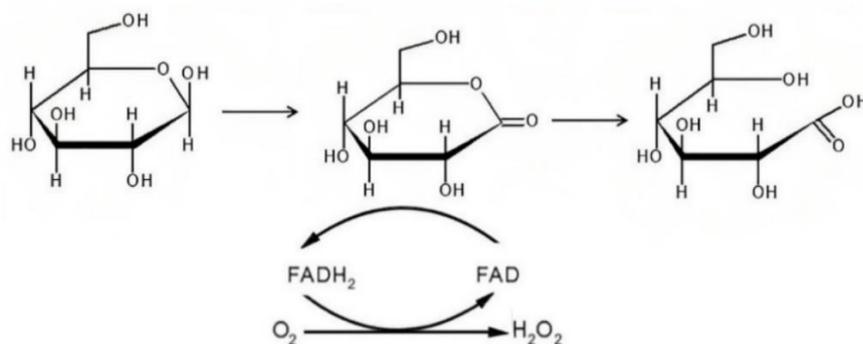


Figura 3. Oxidación de glucosa a ácido glucónico y formación de peróxido de hidrógeno (Brudzynsky, 2020).

De los ácidos orgánicos, es importante destacar que contribuyen de manera crucial a las propiedades organolépticas como el color, aroma y sabor; propiedades químicas como el pH y al estado físico de las mieles (Mato y col., 2003). Dentro de los ácidos orgánicos, el que se encuentra en mayor cantidad en la miel corresponde al ácido glucónico, el cual resulta de la actividad de la GOx tal como se mencionó anteriormente. También, se pueden encontrar otros ácidos orgánicos relevantes como el cítrico, útil para distinguir entre mieles florales y de mielada; el acético, que puede indicar que existe fermentación (Mato y col., 2006) y el levulínico y fórmico que pueden provenir de 5-HMF en reacciones sucesivas con moléculas de agua que se encuentren presentes en la miel aumentando así la acidez del medio (da Silva y col., 2016).

Finalmente, se encuentran los compuestos fenólicos, que corresponden a metabolitos secundarios derivados de las plantas desde donde las abejas recolectan el néctar y polen. Dentro de este grupo existen aproximadamente 10.000 moléculas diferentes que se agrupan en diferentes clases según su estructura química, donde se encuentran los ácidos fenólicos y los flavonoides. Se ha reportado en mieles de distinto origen botánico que los ácidos fenólicos encontrados con mayor frecuencia corresponden a ácido cumárico, ácido gálico, ácido siríngico, ácido cinámico, ácido cafeico y ácido ferúlico, mientras que entre los flavonoides están kaempferol, luteolina, crisina, quercetina, galangina, pinocembrina, pinobanksina, miricetina y apigenina. Estos compuestos, se destacan principalmente debido a su capacidad para eliminar o reducir la formación de radicales libres, más conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS) (Cianciosi y col., 2018).

1.3 Propiedades de la miel

Desde la antigüedad, la miel no solo se ha considerado un alimento o edulcorante, sino que también se ha utilizado como medicamento para estimular la cicatrización de heridas, la regeneración de tejidos y el alivio de los trastornos gastrointestinales, la gingivitis y otras patologías. Los responsables de este efecto terapéutico son varios componentes entre los que destacan los compuestos fenólicos. Varios estudios in vivo e in vitro han demostrado la actividad antimicrobiana, antiviral, antifúngica, anticancerígena y antidiabética de la miel además de demostrar efecto protector sobre el sistema cardiovascular, nervioso, respiratorio y gastrointestinal (Alvarez-Suarez y col., 2013). Análogamente, hoy en día la sociedad está constantemente enfrentándose a nuevos patógenos resistentes a los antibióticos por el uso inadecuado de ellos. Este tipo de resistencia a los agentes antimicrobianos representa una amenaza muy grave para la salud mundial, por lo cual, se necesitan urgentemente estrategias antimicrobianas alternativas, reevaluando el uso terapéutico de la medicina antigua, como la miel (Mandal, M. & Mandal, S., 2011).

Con respecto a la actividad bacteriostática y bactericida en mieles, se ha reportado que está asociada a la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual puede eliminar una gran variedad de microorganismos como bacterias patógenas Gram (+) y Gram (-) por oxidación a través de su acción directa o por medio de radical hidroxilo producido a partir de este (Brudzynski y col., 2011; Brudzynski & Lannigan, 2012). Se ha reportado que la cantidad de peróxido de hidrógeno producida por la miel está correlacionada significativamente con la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración bactericida mínima (MBC) de la miel (Brudzynsky, 2020). Con respecto a la producción de H_2O_2 , éste se produce por la reducción de oxígeno

empleado al oxidar glucosa a ácido glucónico, tal como se mencionó anteriormente. Sin embargo, se ha observado una falta de correlación entre la actividad de la GOx y la producción de H₂O₂ (Bucekova y col., 2018 & 2019). Por ello, la actividad de la glucosa oxidasa no representaría un parámetro certero para la predicción del contenido de peróxido de hidrógeno ni de la actividad antibacteriana de la miel, sino que, habría otros factores que contribuyen de manera significativa en ambos casos, como el pH ácido, proteínas como la defensina-1 y los polifenoles (Kwakman y col., 2010; Strelec y col., 2018). En este sentido, los resultados presentados por varios autores indicarían que el peróxido de hidrógeno en la miel también se produce a través de una vía alternativa no enzimática (Bucekova y col., 2018 y 2019; Brudzynski y col., 2012); donde los compuestos fenólicos, como los flavonoides, tendrían un rol relevante mediante una acción prooxidante. Por ello se ha planteado que, si bien la presencia de H₂O₂ es importante para la inhibición del crecimiento bacteriano, los flavonoides y su relación con éste serían uno de los factores responsables de la actividad antibacteriana de la miel (Bucekova y col., 2018).

1.4 Acción prooxidante de los flavonoides

Como se mencionó en párrafos anteriores, los flavonoides son un tipo de compuesto fenólico, su estructura química consta de 15 carbonos (C₆-C₃-C₆), los cuales se agrupan en dos anillos aromáticos (A y B) conectados por un puente de 3 carbonos que da lugar a un heterociclo oxigenado (C), como se observa en la Figura 4 (Chávez-González y col., 2020).

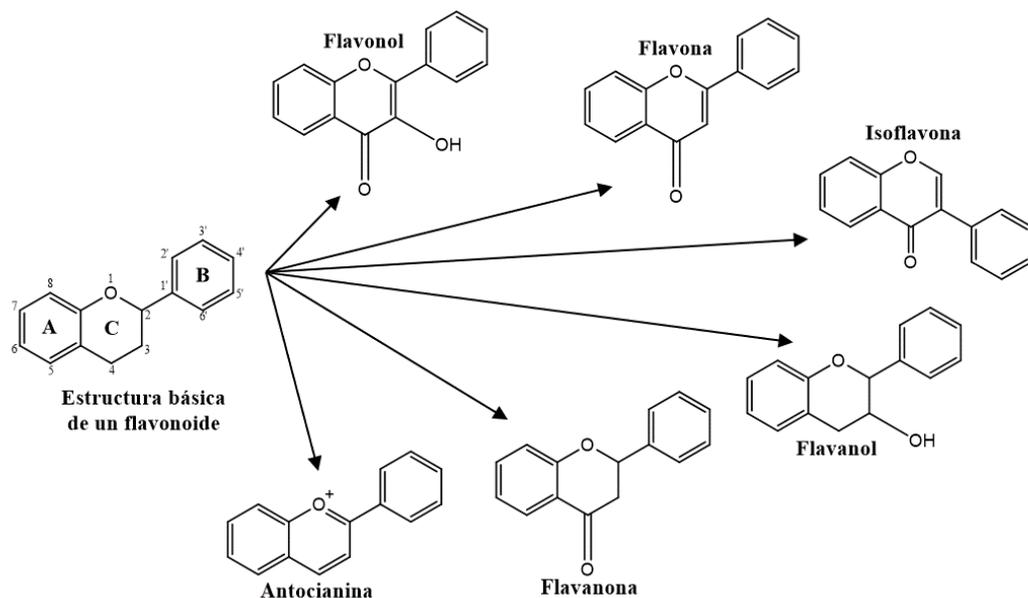


Figura 4. Estructura básica flavonoides y sus derivados (Chávez-González y col., 2020).

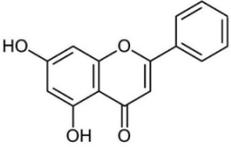
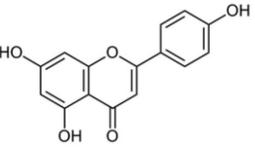
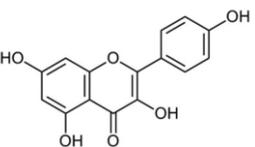
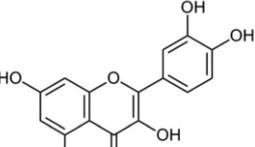
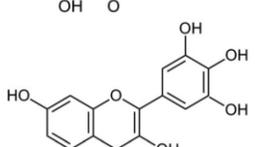
Los flavonoides, se pueden subdividir en diferentes subgrupos según el carbono del anillo C al que se une el anillo B y el grado de insaturación y oxidación del anillo C. Las variaciones en la estructura básica de los flavonoides dan lugar a seis clases diferentes de este grupo de compuestos: flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanoles, flavanonas y antocianinas (Panche y col., 2016).

Estos compuestos fenólicos son los pigmentos más comunes dentro del reino vegetal junto con la clorofila y los carotenoides. Se ha reportado que gracias a sus atractivos colores algunos flavonoides como las flavonas y los flavonoles actúan como señales visuales para los insectos polinizadores (Stalikas, 2007), lo cual coincide con las cantidades encontradas en distintas mieles (Cianciosi y col., 2018).

En la Tabla 1 se presentan las estructuras y algunas propiedades de cinco flavonoides habitualmente presentes en la miel y que han sido considerados en

el presente estudio, destacando la cantidad y disposición de los grupos hidroxilo en las moléculas, ordenados de menor a mayor cantidad.

Tabla 1. Estructuras y propiedades de los cinco flavonoides considerados en el presente estudio.

Flavonoide	Estructura	Tipo	Peso molecular g/mol	Solubilidad g/L a 25°C
Crisina		Flavona	254,22	0,10
Apigenina		Flavona	270,05	0,12
Kaempferol		Flavonol	286,23	0,18
Quercetina		Flavonol	302,24	0,26
Miricetina		Flavonol	318,04	0,30

Los flavonoides actúan como antioxidantes al reducir radicales libres con formación de radicales fenoxilo que pueden reaccionar con un segundo radical, adquiriendo una estructura de quinona estable (Figura 5A y 5B). Sin embargo, el radical fenoxilo también puede interactuar con el oxígeno molecular (autooxidación), generando quinonas y anión superóxido; antes que terminar la reacción en cadena (Figura 5C). Además, esta reacción tiene un carácter

autocatalítico ya que el anión superóxido oxida el compuesto original para regenerar el radical fenoxilo y producir H_2O_2 (Figura 5D), dando cuenta así de la acción prooxidante de los flavonoides. El radical fenoxilo (más propenso a la autooxidación que el flavonoide correspondiente) y el anión superóxido muestra un papel catalítico en esta reacción (Pietta 2000; Sakihama y col., 2002; Amic y col., 2007). El H_2O_2 formado por oxidación del radical fenoxilo puede reaccionar con Fe^{2+} o Cu^+ , en una reacción Fenton o tipo Fenton, produciendo radical hidroxilo (Figura 5E). Estas reacciones se verían favorecidas al pH de la miel (alrededor de 4) donde la concentración de las ROS formadas dependerá de la disponibilidad de oxígeno, el que a su vez depende del grado de dilución de la miel (Yupanqui y col., 2022).

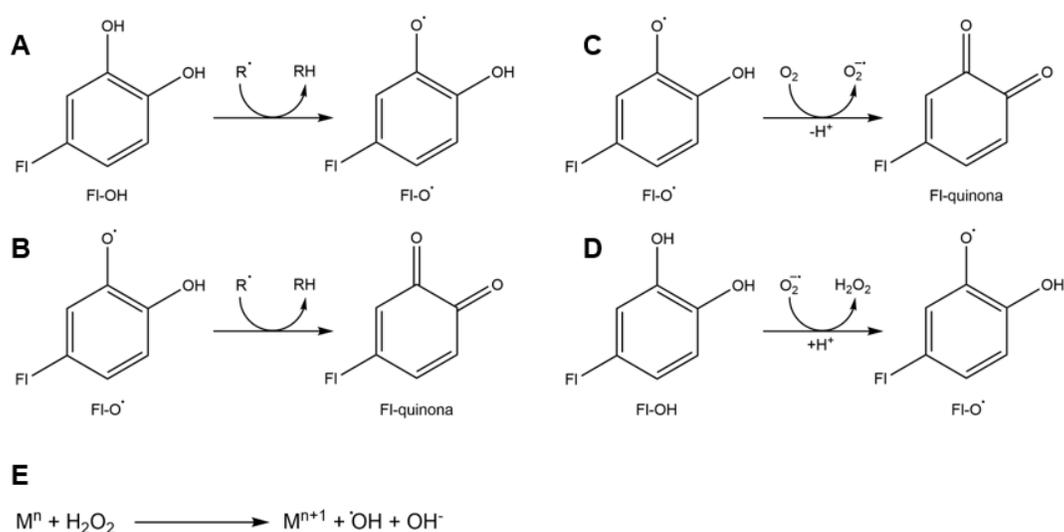


Figura 5. **A y B)** Eliminación del radical libre (R^\cdot) por flavonoides (FI-OH) mediante donación directa de átomos de hidrógeno (acción antioxidante). **C y D)** Generación de anión superóxido y peróxido de hidrógeno por autooxidación del radical flavonoide fenoxilo (FI-O^\cdot) y oxidación del compuesto original por anión superóxido (acción prooxidante), respectivamente. **E)** Reacción de Fenton ($\text{M}^n = \text{Fe}^{2+}$) o tipo Fenton ($\text{M}^n = \text{Cu}^{1+}; \text{Mn}^{2+}$) que produce radical hidroxilo.

La actividad prooxidante de los flavonoides es directamente proporcional al número total de grupos hidroxilo en la molécula y aumenta en presencia de iones de metales de transición como Cu^{2+} y Fe^{3+} que facilitan el transporte de electrones desde los flavonoides al oxígeno molecular (Hajii y col., 2006; Selvaraj y col., 2014). Este efecto está asociado con la capacidad de los flavonoides para quelar cationes metálicos. Existen tres criterios estructurales en los flavonoides que favorecen la unión de los metales de transición y la doble acción antioxidante/prooxidante (Figura 6): Una estructura o-dihidroxi en el anillo B, un doble enlace de 2,3 en conjugación con un grupo 4-oxo en el anillo C y finalmente, grupos 3- y 5-OH con un grupo 4-oxo en los anillos A y C, respectivamente (Miura y col., 1998). En este sentido, se ha reportado que los flavonoides altamente reductores son moléculas sensibles al aire, por lo cual pueden sufrir una autooxidación con oxígeno molecular para producir ROS siguiendo las reacciones antes presentadas en la Figura 5 (Hajii y col., 2006).

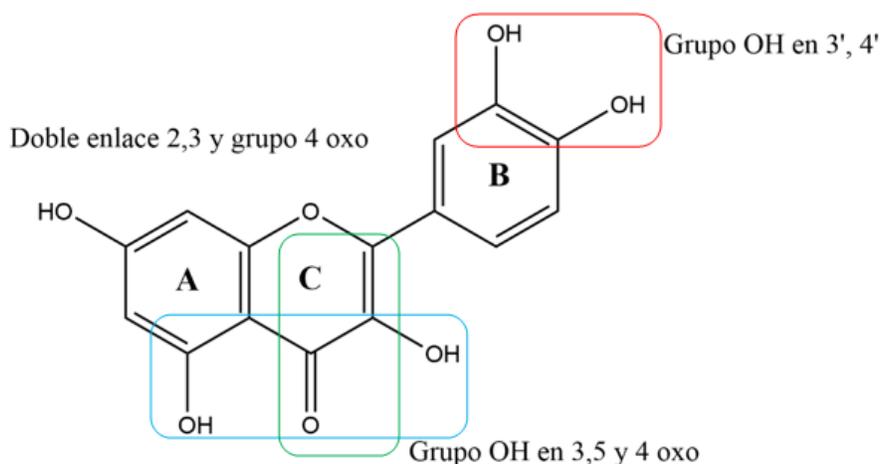


Figura 6. Criterios estructurales en los flavonoides que favorecen la unión de los metales de transición y la doble acción antioxidante/prooxidante: Una estructura o-dihidroxi en el anillo B, un doble enlace de 2,3 en conjugación con un grupo 4-oxo en el anillo en el anillo C y grupos 3- y 5-OH con un grupo 4-oxo en los anillos A y C, respectivamente.

Para la acción prooxidante favorecida por Cu(II), la reacción inicial implicaría la complejación de este catión por parte del flavonoide y su posterior reducción a Cu(I), con la oxidación del flavonoide a una semiquinona (en una reacción intramolecular); que luego sería oxidada nuevamente por oxígeno con la formación de H₂O₂. Posteriormente, el H₂O₂ formado reaccionaría con Cu(I) en una reacción tipo Fenton produciendo radical hidroxilo, que puede dañar el ADN; reciclando además el Cu(II) (acción catalítica) (Figura 7) (Sakihama y col., 2002). Reacciones similares ocurrirían con Fe(III), finalizando con una reacción Fenton y generación de radical OH (Hajji y col., 2006).

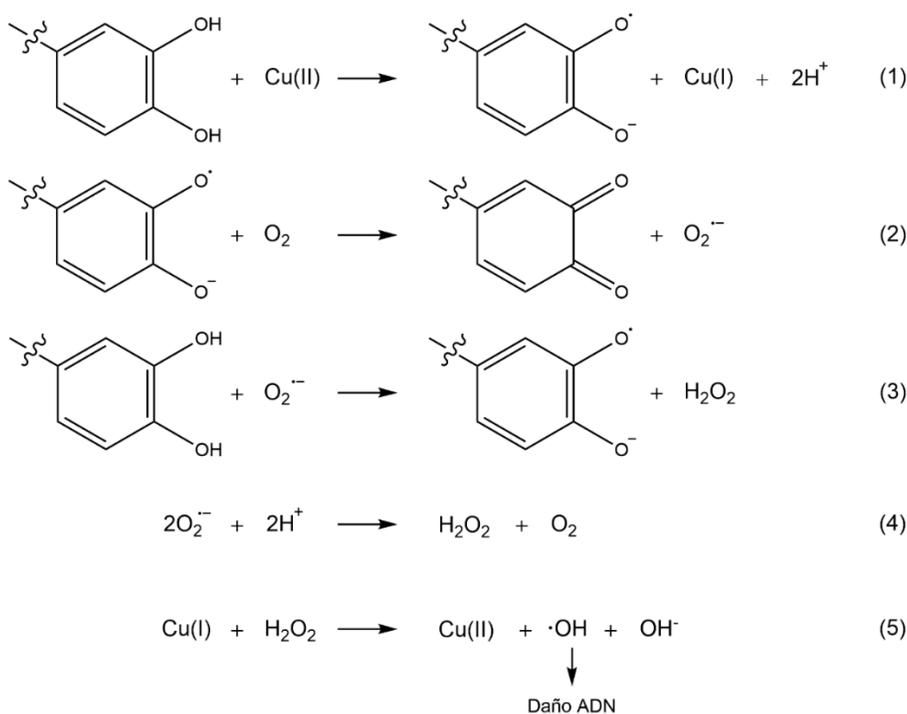


Figura 7. Mecanismo de reacción de flavonoides actuando como agentes prooxidantes con producción de ROS en presencia de Cu²⁺. El Cu²⁺ oxida el flavonoide a una semiquinona que luego es oxidada por O₂ a quinona con producción de radical superóxido. Este, luego puede generar peróxido de hidrógeno, el que por una reacción tipo Fenton con Cu¹⁺ produce el radical hidroxilo que provoca daño en el ADN bacteriano (Sakihama y col., 2002).

Se ha reportado que la quercetina en presencia de Cu(II) muestra acción prooxidante al cumplir los criterios estructurales necesarios (Figura 6) (Haijii y col., 2006). Por otra parte, se reporta que Fe(III) participaría en la escisión oxidativa del ADN bacteriano inducida por complejos flavonoide-Fe(III) (El Amrani y col., 2006). Estos autores proponen un mecanismo de transferencia de electrones en la que el Fe(III) toma un electrón del átomo de carbono vecino al grupo 3-hidroxi-4-ceto ubicado en el anillo C, lo que genera un complejo flavonoide-Fe(II). Luego, el complejo ferroso se une al ADN, resultando en la formación de especies reactivas de oxígeno, la escisión del ADN y el efecto antibacteriano. Por otra parte, estudios recientes indican que la presencia de Mn(II) aumenta la actividad antioxidante y antibacteriana de la flavona luteolina por su complejación a los sitios 5-hidroxi y 4-carbonilo (Dong y col., 2017) por lo cual, Mn(II) podría desempeñar un papel relevante en la producción de radical hidroxilo mediante una reacción tipo Fenton con peróxido de hidrógeno (Bokare y Choi, 2014).

De acuerdo a los antecedentes anteriormente expuestos es claro que la miel presenta actividad antibacteriana debido a la generación de ROS. Sin embargo, las relaciones que existen entre los componentes como los flavonoles, flavonas, iones metálicos y la formación de especies reactivas de oxígeno en la miel no han sido abordadas de manera sistemática. Es por esto, que el presente estudio busca evaluar cómo se ve influenciada la producción de H_2O_2 por autooxidación de un grupo de flavonoles y flavonas frecuentemente encontrados en la miel en presencia de Fe(III) y Cu(II).

2 HIPÓTESIS

La generación de peróxido de hidrógeno en la miel depende, entre otros factores, de su contenido de flavonoides (flavonoles y flavonas) y es modulada por la presencia de Fe(III) y Cu(II).

3 OBJETIVO GENERAL

Relacionar la generación de peróxido de hidrógeno en miel con su contenido de flavonoles (quercetina, kaempferol y miricetina) y flavonas (crisina y apigenina) con la presencia de Fe(III) y Cu(II).

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Determinar el contenido de los flavonoles (quercetina, kaempferol y miricetina) y flavonas (crisina y apigenina) en mieles de la zona centro-sur de Chile.
- 2 Cuantificar el contenido de metales (hierro y cobre) en muestras de miel de la zona centro-sur de Chile.
- 3 Evaluar el efecto de la dilución, presencia de Fe(III), Cu(II), quelantes metálicos y acción de proteinasa K sobre la generación de H₂O₂ en mieles de la zona centro-sur de Chile.
- 4 Evaluar la generación de peróxido de hidrógeno por autooxidación de los flavonoles y flavonas en medio de miel sintética en ausencia y presencia de Fe(III) y Cu(II).
- 5 Evaluar la generación de peróxido de hidrógeno en extractos de miel concentrados y agotados en flavonoles y flavonas en ausencia y presencia de Fe(III).

5 MATERIALES

Para este trabajo, se utilizó material de vidrio de uso general y volumétrico clase A, junto con micropipetas de desplazamiento de aire de 20-200, 100-1000, 5000 y 10000 μL , viales ámbar tapa rosca, tubos de centrifuga de 1,5, 15 y 50 mL, viales autosampler total recovery para HPLC, cartuchos C18 (UCT $\text{\textcircled{R}}$, 500 mg, 6 mL de capacidad) y unidades de filtración para centrifuga Amicon Ultra-0,5.

5.1 Reactivos

Crisina estándar analítico. Sigma Aldrich

Kaempferol. Merck

Miricetina. Merck

Apigenina $\geq 95\%$ (HPLC). Sigma Aldrich

Quercetina $\geq 95\%$ (HPLC). Sigma Aldrich

Peroxidasa rábano picante, actividad 277 U/mg. Merck

O-Dianisidina diclorhidrato, purificada para uso con Peroxidasa. Sigma Aldrich

Proteinasa K, Tritirachium album, 43 mAnsonU/mgP. Merck

Hidrogenofosfato de di-Sodio anhidro para biología molecular. Merck

Potasio dihidrogenofosfato para análisis EMSURE $\text{\textcircled{R}}$. Merck

Hierro(III) cloruro hexahidrato para análisis EMSURE $\text{\textcircled{R}}$. Supelco

Cobre(II) sulfato pentahidrato para análisis EMSURE $\text{\textcircled{R}}$. Supelco

D(+)-Glucosa anhidra para bioquímica. Millipore

D(-)-Fructosa para bioquímica. Millipore

Sacarosa P.A.- A.C.S, reactivo analítico. Synth

Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético dihidrato 98%. Fluka

Nitrógeno extra puro 99,995%. Linde

5.2 Solventes

Acetonitrilo Multisolvente® grado HPLC. Scharlau

Metanol grado HPLC $\geq 99,9\%$ CHROMASOLV™. Honeywell

Ácido fórmico para análisis 98-100% EMSURE®. Supelco

Ácido clorhídrico fumante para análisis 37% EMSURE®. Merck

Ácido nítrico 65% SUPRAPUR®. Supelco

Peróxido de Hidrógeno 30% Perhydrol® estabilizado para almacenamiento a altas temperaturas, para análisis EMSURE®. Merck

5.3 Equipos

Balanza analítica modelo 360 ES ($\pm 0,01$ mg). Precisa

Balanza de precisión modelo 4000C ($\pm 0,01$ g). Precisa

pHmetro (Vernon Hills, USA) modelo pH 1100. Oakton

Centrífuga Orto alresa, modelo DIGICEN 21-R, 230-220 v 50-60 Hz

Micro Centrífuga Hermle (Alemania) modelo Z216M

Microondas Milestone MLS-1200 MEGA, equipado com rotor de polipropileno de 10 vasos de teflón

Espectrofotómetro UV-Vis Agilent Technologies, modelo Cary 8454, equipado con detector de arreglo de diodos. Software Instrument 1 online

Sistema HPLC Waters Alliance, modelo e2695, equipado con detector de diodos modelo Waters 996 Photodiode Array Detector y de fluorescencia modelo 2475 Waters 2475 Multi λ Fluorescence Detector. Software Empower

Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente, modelo iAP-RQ Serie: RQ01282, equipado con inyector automático modelo 4DX. Software Qtegra

Sistema de purificación de agua Synergy® para agua ultra pura (tipo 1)

Evaporador de solvente AccuBlock™ Digital Dry Bath modelo D1200-230V. Labnet

5.4 Software

Statgraphics Centurion XV versión 15.1.02

The Unscrambler versión 9.7

5.5 Muestras

Se emplearon 15 muestras de miel de la zona centro-sur de Chile, de diversa procedencia geográfica y botánica, distribuidas entre las regiones de Coquimbo y Los Lagos. Estas mieles fueron recolectadas en los periodos 2017-2023. Las muestras utilizadas fueron compradas directamente a apicultores o pequeños productores artesanales y congeladas hasta su análisis. El detalle de las muestras de miel se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Muestras de miel estudiadas según codificación, origen botánico, año de recolección y región.

N°	Codificación	Tipo de miel	Año de recolección	Región
1	M1-IV	Multifloral	2019	Coquimbo
2	M29-IV	Multifloral	2023	Coquimbo
3	M5-V	Multifloral	2017	Valparaíso
4	M6-V	Multifloral	2021	Valparaíso
5	M27-V	Multifloral	2022	Valparaíso
6	M8-RM	Ulmo	2019	Metropolitana
7	M9-RM	Quillay	2019	Metropolitana
8	M28-RM	Multifloral	2022	Metropolitana
9	M13-VI	Multifloral	2019	O'Higgins
10	M14-VI	Multifloral	2019	O'Higgins
11	M16-VI	Multifloral	2017	O'Higgins
12	M18-VII	Multifloral	2020	Maule
13	M22-IX	Multifloral	2019	La Araucanía
14	M23-X	Multifloral	2020	Los Lagos
15	M25-X	Tiaca	2019	Los Lagos

6 MÉTODOS

6.1 Determinar el contenido de flavonoles (quercetina, kaempferol y miricetina) y flavonas (crisina y apigenina) en mieles de la zona centro-sur de Chile

6.1.1 Extracción de flavonoles y flavonas en muestras de miel (Obtención de extractos concentrados y agotados en flavonoides)

Se realizó la extracción de compuestos fenólicos desde miel mediante extracción en fase sólida, conocida como SPE (Solid-Phase Extraction). Esta extracción, se caracteriza por ser simple, ya que es más rápida y menos costosa que otras técnicas de extracción debido a que requiere menos cantidad de solvente. Además, genera menos residuos, contribuyendo a prácticas más sostenibles y amigables con el medioambiente.

Para ello, se utilizó la metodología descrita por Yung y col. (2016), con algunas modificaciones. En primer lugar, se pesó 1 g de miel y se disolvió en 2 mL de HCl 0,01 M. Se utilizaron cartuchos C18 (UCT ®, 500 mg, 6 mL de capacidad) que fueron acondicionados secuencialmente pasando 3 mL de metanol y 3 mL de HCl 0,01 M. La miel diluida (2 mL), se cargó en el cartucho preacondicionado y se eluyó a un flujo constante para garantizar una adsorción eficiente de los flavonoides conservando el eluato acuoso que se denominó extracto agotado en flavonoides (EA) al cual se le determinó posteriormente la generación de peróxido de hidrógeno (objetivo específico N°5). Luego, el cartucho SPE se lavó con 4 mL de HCl 0,01 M para eliminar los azúcares y cualquier compuesto residual. La elución de los flavonoides retenidos en el cartucho se realizó añadiendo 5 mL de MeOH acidificado a pH 2 con HCl. El eluato obtenido se recogió y se concentró mediante un evaporador con corriente

de nitrógeno a 60°C, para posteriormente reconstituir en 1 mL de agua ultrapura, que se denominó extracto concentrado en flavonoides (EC). Para la cuantificación de flavonoides se utilizaron 0,5 mL de este extracto y los 0,5 mL restantes se utilizaron para la determinación del peróxido de hidrógeno (objetivo específico N°5). La extracción se realizó en triplicado.

6.1.2 Curva de calibración y cuantificación de flavonoles y flavonas mediante HPLD-DAD

Se utilizó una columna C-18 (Aeris™ 3,6 µm PEPTIDE XB-C18 100 x 21 mm). Donde el horno de columna se mantuvo a 35°C, flujo de 1,0 mL/min utilizando como fase móvil agua pH 2.5 con ácido fórmico 1M (A) y acetonitrilo (B). La separación se realizó por medio de una gradiente que siguió el siguiente programa de elución: 0-22 min., 8% a 50% de (B), 22-24 min., 50% de (B) constante, 24-27 min., 50% a 8% de (B), 27-30 min., 8% de (B) constante (se volvió a las condiciones iniciales y se mantuvo, para estabilizarse y comenzar con la siguiente muestra). Se inyectaron 20 µL del EC obtenido por el proceso SPE y los cromatogramas se registraron a 260 nm para los flavonoides de interés. La identificación se efectuó por medio de la comparación del tiempo de retención y los espectros de absorción de cada estándar.

Para las curvas de calibración de cada compuesto de interés, se prepararon soluciones multiestándar de 1000 mg/L en metanol de los cinco flavonoides evaluados (miricetina, quercetina, apigenina, kaempferol y crisina), las cuales se utilizaron como stock para las diluciones que se utilizaron como puntos de la curva, que fueron de 0,25; 0,5; 1; 2; 4 y 6 mg/L. La determinación de los flavonoles y flavonas de interés se realizó en triplicado.

6.1.3 Validación

Para validar la metodología, es crucial tener un conocimiento detallado de las propiedades analíticas. Los resultados relacionados con la linealidad, el límite de detección (LOD), el límite de cuantificación (LOQ), la precisión (%RSD), y la recuperación (%Re) son considerados como parámetros esenciales para asegurar la validación efectiva del método analítico.

6.1.3.1 Linealidad

Se obtuvo la expresión lineal al graficar la concentración de cada flavonol y flavona en función del área obtenida. Esto permitió derivar la ecuación de la recta $y=mx+b$ donde m representa la pendiente, x representa la concentración, b representa el intercepto y finalmente y , que representa el área. La evaluación de la linealidad de los datos se basó en los valores de los coeficientes de determinación (R^2).

6.1.3.2 LOD, LOQ y Sensibilidad

Los límites de detección y cuantificación se estimaron disminuyendo la concentración de los analitos hasta alcanzar los picos cromatográficos donde las señales eran tres y diez veces más grandes que el ruido, respectivamente. Es por ello, que la sensibilidad del método se calculó mediante la siguiente expresión: $S=LOQ/10$.

6.1.3.3 Precisión

Se evaluó la precisión a nivel de repetitividad utilizando la muestra M28-RM en duplicado, la cual fue fortificada a dos niveles de concentración que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones de flavonoide agregadas a M28-RM en $\mu\text{g/g}$ de miel para la validación.

Validación	Flavonoide $\mu\text{g/g}$ de miel				
	Miricetina	Quercetina	Apigenina	Kaempferol	Crisina
V1	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25
V1'	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25
V2	1	0,5	0,5	0,5	0,5
V2'	1	0,5	0,5	0,5	0,5

La precisión fue expresada como la desviación estándar relativa (%RSD) mediante la ecuación $\%RSD=(\sigma/\bar{x})*100$, donde σ representa la desviación estándar de las mediciones y \bar{x} representa la concentración promedio de las muestras.

6.1.3.4 Exactitud

Se determinó la exactitud a partir de la recuperación, la cual fue calculada bajo la ecuación $\%Re=[(Cs-C)/Ca]*100$, donde Cs representa la concentración de las muestras fortificadas, C representa la concentración de las muestras no fortificadas y Ca representa la concentración agregada.

6.2 Cuantificar el contenido de metales (hierro y cobre) en muestras de miel de la zona centro-sur de Chile

Para la cuantificación de hierro y cobre, se utilizó la metodología descrita por Taube y col. (2019), con modificaciones. Las muestras fueron mineralizadas con el fin de eliminar la materia orgánica mediante digestión ácida asistida por microondas. Se pesaron 2 g de miel en recipientes de teflón del horno de microondas y se le añadieron 4 mL de HNO_3 63% p/p suprapuro, para dejar reposando las muestras durante toda la noche. Luego, se agregó 4 mL de H_2O_2 30% p/p para continuar con la digestión. Posteriormente, los vasos se cerraron

y fueron sometidos al programa de potencia que se describe a continuación: 80 W por 2 minutos, 100 W por 1 minuto, 120 W por 2 minutos, 320 W por 5 minutos, finalizando el ciclo con 520 W durante 10 minutos. Posterior a la digestión, los vasos se enfriaron con agua y el digerido se llevó a 50 mL con agua ultrapura. La cuantificación de los metales se realizó mediante ICP-MS con solución estándar multielemento de 1 a 300 µg/L.

6.3 Evaluar el efecto de la dilución de la miel, presencia de Fe(III), Cu(II), quelantes metálicos y acción de proteinasa K sobre la generación de H₂O₂

6.3.1 Determinación de H₂O₂

Para la cuantificación de H₂O₂, se utilizó el método descrito por Kwakman y col. (2010), el cual se basa en la oxidación de orto-dianisidina (ODN) por el peróxido de hidrógeno en donde la enzima peroxidasa actúa como catalizador dentro de la reacción, generando un cromóforo que se determina por espectroscopía UV-Vis a 440 nm, tal como se muestra en la Figura 8.

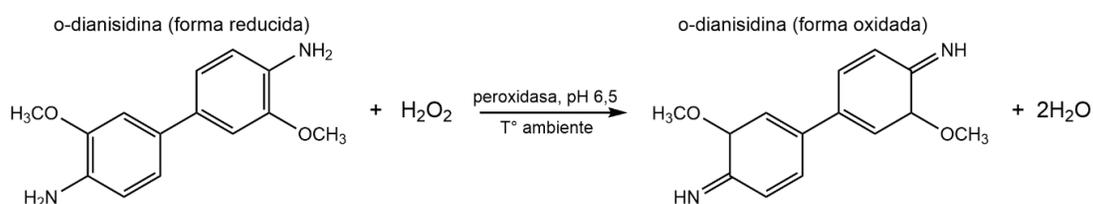


Figura 8. Esquema de reacción entre ODN y H₂O₂ catalizada por la enzima peroxidasa.

Para la preparación de la curva de calibrado se empleó una solución de ODN 0,4 mg/mL en agua ultrapura y una solución de enzima peroxidasa en buffer fosfato 0,01 M a pH 6,5 de 0,025 mg/mL (actividad 7 U/mL). Se preparó la

curva de calibrado a partir de una solución de H₂O₂ de 333 mg/L, entre 0,25 y 10 mg/L en buffer fosfato 0,01 M pH 6,5, utilizando los siguientes volúmenes:

Tabla 4. Alícuotas de calibrador y reactivos para la curva de calibrado.

Reactivo	Calibrador (mL)	Buffer fosfato (mL)	Peroxidasa (mL)	ODN (mL)	Volumen final (mL)
Blanco	0	2,25	0,5	0	2,75
Patrón o muestra	0,5	1,5	0,5	0,25	2,75

La mezcla se agitó y se dejó reaccionar por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, posteriormente se midió la absorbancia a 440 nm. Todos los ensayos de acumulación de H₂O₂ se efectuaron en duplicado.

6.3.2 Efecto de la dilución de la miel

Para evaluar el efecto de la dilución de la miel sobre la generación de peróxido de hidrógeno, se pesaron en tubos Falcon de 50 mL las cantidades necesarias para tener diluciones al 3, 6, 12, 20, 25 y 50% p/v, con el fin de observar a qué dilución se produce la mayor cantidad de H₂O₂. Las cantidades pesadas, fueron disueltas en 20 mL de agua ultrapura con ayuda de un vórtex y luego centrifugadas durante 10 min a 8000 rpm. Las soluciones libres de impurezas se trasvasijaron a un matraz de aforo de 25 mL enrasando con agua milli-q. Luego se llevaron a incubación en oscuridad durante 3 horas en viales color ámbar de 15 mL. Posteriormente se determinó la concentración de H₂O₂ de acuerdo a los detalles dados en la sección 6.3.1.

6.3.3 Efecto de Fe(III), Cu(II), quelantes metálicos y acción de proteinasa K en muestras de miel

Se evaluó el efecto de la presencia de Fe(III), Cu(II), EDTA y acción de proteinasa K sobre la generación de H₂O₂ en mieles diluidas al 20% p/v (dilución de máxima generación de acuerdo al resultado del punto 7.3.1) luego de ser incubadas durante 3 horas en oscuridad.

6.3.3.1 Soluciones de Fe(III) y Cu(II)

Se prepararon soluciones de FeCl₃·6H₂O 0,005 M y CuSO₄·5H₂O 0,005 M en agua milli-q. De estas soluciones se añadieron los volúmenes necesarios a las muestras de miel al 20% p/v para obtener una concentración de 50 y 30 µM de Fe(III) y Cu(II), respectivamente.

6.3.3.2 Solución de EDTA

Se preparó una solución de EDTA 0,005 M en agua milli-q con el fin de agregar un exceso de EDTA en las muestras. Para ello, se añadió el volumen necesario a las muestras de miel al 20% p/v para obtener una concentración de 200 µM de EDTA.

6.3.3.3 Solución de Proteinasa-K

Se utilizó la metodología descrita por Bucekova y col. (2019) con modificaciones, donde se preparó una solución de Proteinasa-K de 0,7 mg/mL (30 U/mL) en agua. Posteriormente, se añadió el volumen necesario a las muestras de miel al 20% p/v para obtener una concentración de 1,5 U/mL.

6.4 Evaluar la generación de peróxido de hidrógeno por autooxidación de los flavonoles y flavonas en medio de miel sintética en ausencia y presencia de Fe(III) y Cu(II)

6.4.1 Preparación miel sintética

Considerando que por cada 100 g de miel hay 80 g de azúcares (30 g de glucosa, 40 g de fructosa y 10 g de disacáridos); una solución de esta al 25% p/v contiene 20% p/v de azúcares. Se pesaron entonces 37,5 g de glucosa, 50 g de fructosa y 12,5 g de sacarosa, cantidad que fue disuelta en 500 mL de buffer fosfato 0,01 M a pH 4 quedando así una solución de miel al 25% p/v; la que luego fue diluida 4:1 obteniendo una solución de miel sintética al 20% (16% p/v de azúcares). Las soluciones se mantuvieron refrigeradas. Para su uso se llevaron a temperatura ambiente.

6.4.2 Diseño experimental

Se ha determinado que en mieles reales la concentración promedio de flavonoides totales, Fe(III) y Cu(II) corresponde a 3 $\mu\text{g/g}$, 6 $\mu\text{g/g}$ y 4 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Por lo cual, para una solución al 20% p/v de miel se esperarían concentraciones de 2 μM , 20 μM y 12 μM , respectivamente.

De acuerdo con ensayos realizados previamente con el flavonoide quercetina, existe una relación molar aproximada de 0,6 mol de H_2O_2 por cada 1 mol de quercetina, por lo cual, en una solución al 20% p/v se obtendría una concentración de 1,2 μM de H_2O_2 , que quedaría fuera del calibrado puesto que el punto mínimo de la curva corresponde a 7,5 μM . Es por esto, que se eligió una concentración mayor a esta, partiendo de una concentración de flavonoide 25 μM (produciría 15 μM de H_2O_2). Por otra parte, se añadió los metales a dos concentraciones: para el caso de Fe(III) a 20 y 50 μM y para el caso de Cu(II) a

12 y 30 μM . Para ello, se tomaron 4 mL de miel sintética al 25% p/v (20% p/v de azúcares) y se le añadió las cantidades necesarias de flavonoide, Fe(III) o Cu(II) según el diseño experimental que se muestra en la Tabla 5, aforando a 5 mL con agua ultrapura.

Tabla 5. Diseño experimental para mieles sintéticas al 20% p/v con flavonoide, Fe(III) y Cu(II).

Flavonoide (μM)	Generación de H_2O_2 μM para las concentraciones indicadas de Fe(III) y Cu(II) μM		
	0	20 y 12	50 y 30
25			
50			
75			
100			
150			
200			

Posteriormente, las muestras se trasvasijaron a un vial color ámbar de 15 mL y fueron incubadas durante dos horas en oscuridad. Posteriormente, se tomaron las mismas cantidades indicadas en la Tabla 4 y se dejaron nuevamente en oscuridad durante 10 minutos para luego determinar la concentración de H_2O_2 mediante espectroscopía UV-Vis a 440 nm en duplicado.

6.4.3 Comparación de la producción de H_2O_2 en mieles reales y sintéticas

Se prepararon mieles sintéticas al 20% p/v con las concentraciones de los flavonoides obtenidas al analizar las mieles reales (objetivo específico N°1) en ausencia y presencia de Fe(III) 50 μM con el fin de realizar la cuantificación de H_2O_2 y comparar la producción entre las mieles reales y las correspondientes sintéticas simuladas.

6.5 Evaluar la generación de peróxido de hidrógeno en extractos de miel concentrados y agotados en flavonoles y flavonas en ausencia y presencia de Fe(III)

Para este punto se utilizó la misma metodología descrita en los puntos anteriores para la determinación de H₂O₂ por espectroscopía UV-Vis. Las muestras fueron hechas en duplicado.

6.5.1 Extracto concentrado (EC)

Se utilizaron 0,5 mL del extracto concentrado (eluato de la SPE), que contiene el equivalente de 0,5 g de miel. Estos fueron llevados a 2,5 mL con tampón pH 4 para obtener el equivalente de una solución de miel al 20% p/v. La solución obtenida fue incubada durante 3 horas a temperatura ambiente en ausencia y presencia de Fe(III) 50 µM y posteriormente se evaluó la generación de H₂O₂.

6.5.2 Extracto agotado (EA)

Se utilizaron los 2,0 mL del extracto agotado (descarte de la carga de la SPE) que contiene el equivalente de 1,0 g de miel. Este fue llevado a 5 mL con tampón pH 4 para obtener el equivalente de una solución de miel al 20% p/v. La solución obtenida, fue incubada durante 3 horas a temperatura ambiente en ausencia y presencia de Fe(III) y posteriormente, se evaluó la generación de H₂O₂.

6.5.3 Extracto agotado deproteinizado (EAD)

Con el fin de eliminar la glucosa oxidasa que genera H₂O₂ por vía enzimática se deproteinizó el extracto agotado (descarte de la carga de la SPE) de tres muestras de miel mediante filtración en tubos Amicon Ultra-0,5 de 3kDa. Para ello se tomaron 0,5 mL del EA (que contiene el equivalente a 0,25 g de miel) y se llevaron a la unidad de filtración, donde se centrifugó a 15000 g y 0°C durante

30 minutos. Posteriormente, el filtrado se llevó a un volumen con tampón pH 4 con tal de obtener el equivalente de una solución al 20% p/v y se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente para posteriormente evaluar la generación de H₂O₂.

6.6 Análisis estadístico

Se realizaron comparaciones de la generación de H₂O₂ en las mieles, bajo las diferentes condiciones consideradas, mediante ANOVA de una vía y multivía utilizando el programa Statgraphics Centurion XV versión 15.1.02. El valor de p (p-value) fue utilizado para determinar si las diferencias observadas entre las medias de los grupos son estadísticamente significativas o simplemente resultado de la variabilidad aleatoria de los datos. Un valor de p-value < 0,05 indica que existen diferencias significativas, lo que implica una probabilidad del 95% de que la SCM del tratamiento difiera de la SCM de los errores. Por otra parte, se llevó a cabo un análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) con el objetivo de evaluar de manera multifactorial el efecto de los cinco flavonoides considerados, Fe(III) y Cu(II) sobre la generación de H₂O₂ en las mieles estudiadas. Este análisis se realizó mediante el programa The Unscrambler versión 9.7.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Determinar el contenido de los flavonoles (quercetina, kaempferol y miricetina) y flavonas (crisina y apigenina) en mieles de la zona centro-sur de Chile

7.1.1 Curva de calibración

Los tiempos de retención y las dos longitudes de onda de mayor absorción de los espectros para cada compuesto se observan en la Tabla 6. Estos datos proporcionan información esencial para la identificación precisa de los flavonoides analizados.

Tabla 6. Tiempos de retención y longitudes de onda máximas para los analitos de estudio.

Analito	Tiempo de retención (min)	λ (nm)
Miricetina	11,49	253,1 - 376,1
Quercetina	14,04	254,3 - 364,1
Apigenina	16,09	266,2 - 336,7
Kaempferol	16,57	265,0 - 364,1
Crisina	21,17	267,4 - 312,7

La Figura 9 presenta el cromatograma de un estándar de los cinco flavonoides registrado a las dos longitudes de onda de máxima absorbancia (260 y 360 nm). Se observa la óptima resolución de los picos cromatográficos dentro del tiempo de análisis. Cabe destacar que se seleccionó la longitud de onda de 260 nm para el análisis de las muestras de miel ya que, a esta, la crisina presenta mayor sensibilidad.

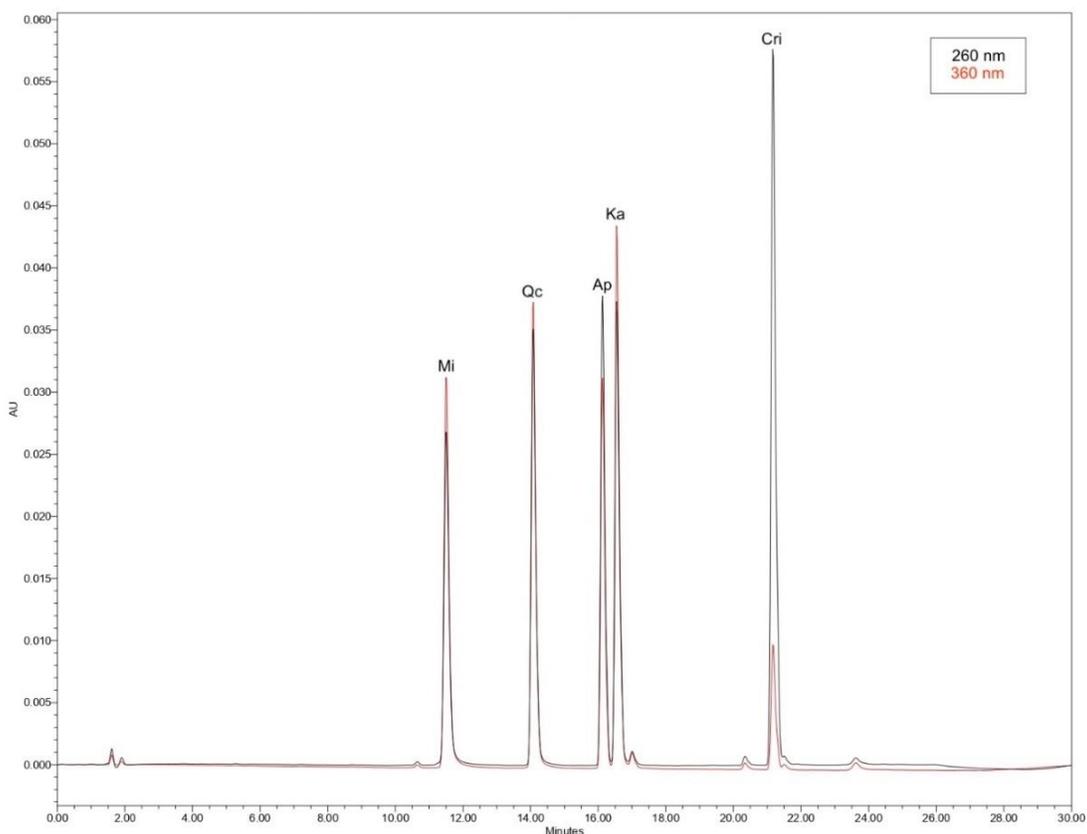


Figura 9. Cromatograma HPLC-DAD de estándares a 260 y 360 nm. Miricetina (Mi), Quercetina (Qc), Apigenina (Ap), Kaempferol (Ka), Crisina (Cri).

En la Figura 10 se presentan los espectros de absorción correspondientes a los patrones empleados, los cuales desempeñaron un papel crucial en la identificación precisa de los flavonoides objeto de estudio. Los espectros para cada estándar son consistentes con la base de datos de PubChem (Kim y col., 2023), confirmando que los estándares con los que se realizó la curva de calibrado son representativos y concuerdan con las propiedades espectroscópicas de los flavonoides analizados.

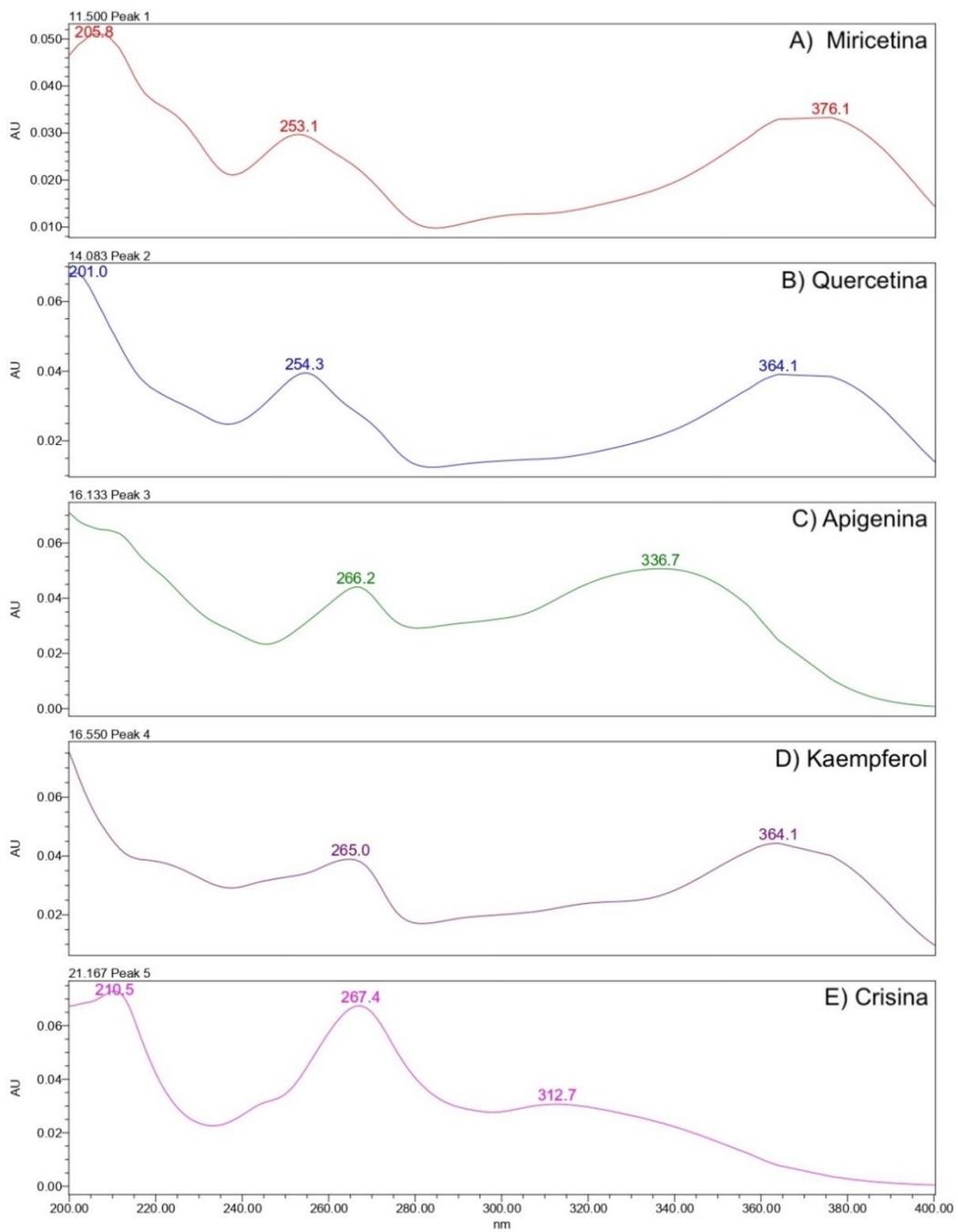


Figura 10. Espectros de absorción de los estándares **A)** Miricetina, **B)** Quercetina, **C)** Apigenina, **D)** Kaempferol, **E)** Crisina.

7.1.2 Cifras de mérito

Para cuantificar los flavonoles Ka, Qc y Mi, así como las flavonas Cri y Ap, se llevaron a cabo los análisis descritos anteriormente para obtener las cifras de mérito de la validación analítica. Estos datos fueron esenciales para la posterior cuantificación de los flavonoides presentes en las muestras de miel. En la Tabla 7, se muestra la linealidad representada por el coeficiente de determinación (R^2), la sensibilidad, los LOD y LOQ, precisión expresada en %RSD y exactitud (%Re) para los 5 flavonoides de estudio.

Tabla 7. Cifras de mérito para la validación de la metodología. Para LOQ se indica entre paréntesis el valor en μM para una miel al 20% p/v.

Flavonoide	R^2	S	LOD	LOQ	%RSD (n=4)	%Re	
						$\mu\text{g/g}$ de miel	V1
Mi	0,9998	0,03	0,09	0,3 (0,2 μM)	2,1	52	56
Qc	0,9999	0,03	0,09	0,3 (0,2 μM)	1,3	107	99
Ap	0,9998	0,05	0,12	0,4 (0,3 μM)	5,8	51	53
Ka	0,9999	0,02	0,06	0,2 (0,1 μM)	0,2	95	115
Cri	0,9998	0,03	0,09	0,3 (0,2 μM)	1,6	91	98

Tal como se observa, el coeficiente de determinación presenta valores entre 0,9998 y 0,9999 lo cual indica una excelente correlación lineal entre las concentraciones conocidas y las respuestas obtenidas. Para el caso del LOD, valores entre 0,06 y 0,12 $\mu\text{g/g}$ de miel representan a las concentraciones mínimas detectables, aunque no necesariamente cuantificables con precisión.

Estos valores sugieren una sensibilidad que es adecuada para poder detectar bajas concentraciones de los analitos en una muestra. Los LOQ estuvieron comprendidos entre 0,2 y 0,4 $\mu\text{g/g}$ de miel e indican el rango de concentraciones mínimas que se pueden cuantificar con precisión y exactitud aceptable, señalando una buena capacidad del método para proporcionar mediciones confiables.

Para el caso de la %RSD, se aprecia que los valores se encuentran entre 0,2% y 5,8% reflejando la precisión del método, indicando una buena repetitividad de las mediciones ya que son valores inferiores al 10%. Para el caso de la exactitud, Ka, Qc y Cri presentaron recuperaciones cercanas al 100%; mientras que para Mi y Ap esta fue solo de un 50%. Debido a esto, los valores obtenidos para estos compuestos en las mieles fueron multiplicados por 2.

En resumen, estos resultados indican que el método analítico posee una alta precisión, sensibilidad, y capacidad para poder detectar y cuantificar analitos en las muestras de miel en un rango específico de concentraciones.

7.1.3 Contenido de flavonoles y flavonas en muestras de miel

La presencia de flavonoides en la miel adquiere relevancia dado que estos compuestos han demostrado poseer propiedades prooxidantes con potenciales beneficios para la salud (Eghbaliferiz & Iranshahi., 2016). En la Tabla 8 se presentan los valores obtenidos de los distintos flavonoides identificados en cada muestra de miel, expresados en unidades de concentración μM resultante en una solución de miel al 20% p/v.

Tabla 8. Contenido de flavonoides específicos identificados en mieles reales.

Miel	Flavonoide / μM en solución de miel al 20% p/v				
	Mi	Qc	Ap	Ka	Cri
M1-IV	-	0,44 \pm 0,02	-	0,28 \pm 0,02	0,76 \pm 0,02
M29-IV	-	0,43 \pm 0,02	0,32 \pm 0,02	0,41 \pm 0,02	1,02 \pm 0,05
M5-V	-	-	-	-	0,31 \pm 0,03
M6-V	0,64 \pm 0,02	1,477 \pm 0,005	-	0,16 \pm 0,01	-
M27-V	-	0,19 \pm 0,02	-	0,81 \pm 0,08	0,99 \pm 0,09
M8-RM	-	0,31 \pm 0,01	-	-	0,22 \pm 0,02
M9-RM	0,38 \pm 0,01	0,36 \pm 0,03	-	1,69 \pm 0,05	0,94 \pm 0,03
M28-RM	0,435 \pm 0,004	0,45 \pm 0,03	0,29 \pm 0,03	2,0 \pm 0,1	1,09 \pm 0,04
M13-VI	-	0,20 \pm 0,02	-	0,68 \pm 0,04	0,63 \pm 0,06
M14-VI	-	0,25 \pm 0,02	-	0,25 \pm 0,02	0,52 \pm 0,01
M16-VI	-	0,26 \pm 0,03	-	0,94 \pm 0,08	0,47 \pm 0,04
M18-VII	-	-	-	1,24 \pm 0,02	1,74 \pm 0,04
M22-IX	-	0,60 \pm 0,02	-	-	1,3 \pm 0,1
M23-X	-	0,20 \pm 0,01	-	1,02 \pm 0,05	1,36 \pm 0,07
M25-X	-	0,57 \pm 0,02	-	-	0,33 \pm 0,03
Promedio	0,5 \pm 0,1	0,4 \pm 0,3	0,31 \pm 0,02	0,9 \pm 0,6	0,8 \pm 0,4

La crisina, quercetina y el kaempferol fueron los flavonoides con mayor frecuencia de aparición en las muestras; mientras que miricetina y apigenina se encontraron solo en tres y dos muestras, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en sus concentraciones (Test Kruskal-Wallis para datos no paramétricos). En la Figura 11 se presenta como ejemplo el cromatograma obtenido para la miel M28-RM, registrado a 260 nm para la determinación de flavonoides.

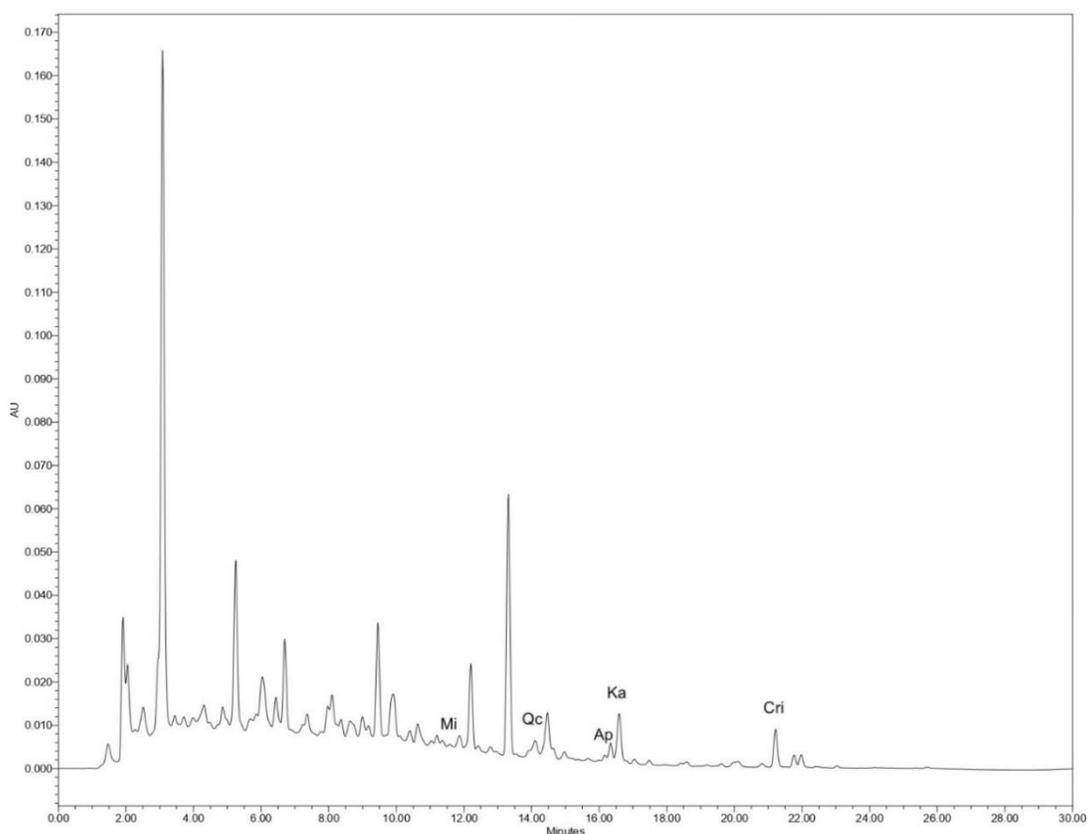


Figura 11. Cromatograma HPLC-DAD muestra M28-RM.

Estos resultados coinciden con los datos presentados en la Tabla 9, donde se evidencia que, en términos generales, la quercetina se posiciona como el flavonol predominante en las mieles de distintos orígenes. Asimismo, en el caso

de las flavonas, la crisina destaca al exhibir la concentración más elevada entre las muestras analizadas por distintos estudios.

Tabla 9. Contenido de flavonoides totales en mieles de distintos orígenes alrededor del mundo (F_T: flavonoides totales).

Origen	Método de análisis	Flavonoides	F_T μM en solución al 20% p/v / μg/g de miel	Autores
Chile	HPLC-MS-MS	Mi, Qc , Ap, Ka y Cri	5±2 / 6±2	Velázquez y col., 2020.
China	HPLC-ECD	Mi, Qc , Ap, Ka y Cri	3,5±0,6 / 4,8±0,8	Zhu y col., 2019.
Australia	HPLC-DAD	Mi , Qc , Ka y Cri	3,8±0,8 / 6±1	Martos y col., 2000.
Chile	HPLC-DAD	Mi, Qc , Ap, Ka y Cri	2±1 / 3±2	Presente estudio.

*Se resalta en negro flavonol y flavona que presenta mayor concentración en mieles.

**Flavonoides totales corresponden a la suma de los 5 flavonoides cuantificados por el método de análisis de cada autor.

La concentración total de los flavonoides hallada en las mieles chilenas es similar a la de otras regiones del mundo. En este punto destaca la importancia de señalar que la variabilidad en la presencia de flavonoides está relacionada con las flores de las cuales las abejas extraen el néctar. Por otra parte, como se puede apreciar en la Figura 12, la concentración de flavonoides totales varía tanto dentro de mieles de una misma región como entre distintas regiones de Chile. Este fenómeno podría atribuirse al estrés hídrico que existe para el caso del norte del país (Nakabayashi y col., 2014) y para la zona sur, al estrés lumínico derivado de la exposición a los rayos UV debido al adelgazamiento de la capa de ozono (Schein y col., 1995; Ferreyra y col., 2021), lo cual, como consecuencia, genera mayor cantidad de estos metabolitos secundarios.

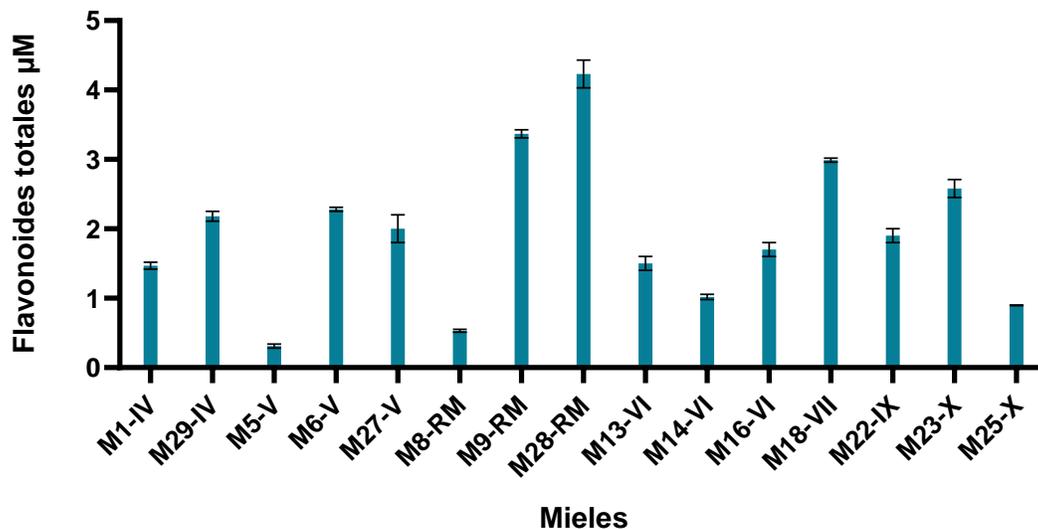


Figura 12. Contenido flavonoides totales en mieles reales diluidas al 20% p/v obtenidos de la suma de los flavonoides detectados por HPLC-DAD.

7.2 Cuantificar el contenido de metales (hierro y cobre) en muestras de miel de la zona centro-sur de Chile

Dentro de los componentes de la miel es de crucial importancia conocer el contenido de metales que pueden encontrarse a niveles traza. Esto incluye metales como hierro y cobre, ya que bajo determinadas condiciones son capaces de formar complejos con los flavonoides, lo que les permite a estos últimos actuar como moléculas prooxidantes y generar ROS. La cantidad de estos metales en la miel puede variar y estar asociada tanto al suelo donde crecen las flores en las que las abejas recolectan el néctar, lo cual indica el origen botánico de las mieles, como a la contaminación ambiental y/o prácticas de procesamiento y envasado de la miel (Sakač y col., 2019).

En la Figura 13 se presenta el contenido de hierro y cobre en las muestras de miel estudiadas de la zona central de Chile. Las concentraciones de hierro varían entre 1,3 y 60,4 µM, mientras que las concentraciones de cobre oscilan entre

0,8 y 33,9 μM en soluciones de miel al 20% p/v. Estos valores concuerdan con los resultados reportados por Lobos y col. (2022), quienes recolectaron muestras de miel durante los años 2019 y 2020 en la zona centro sur de Chile.

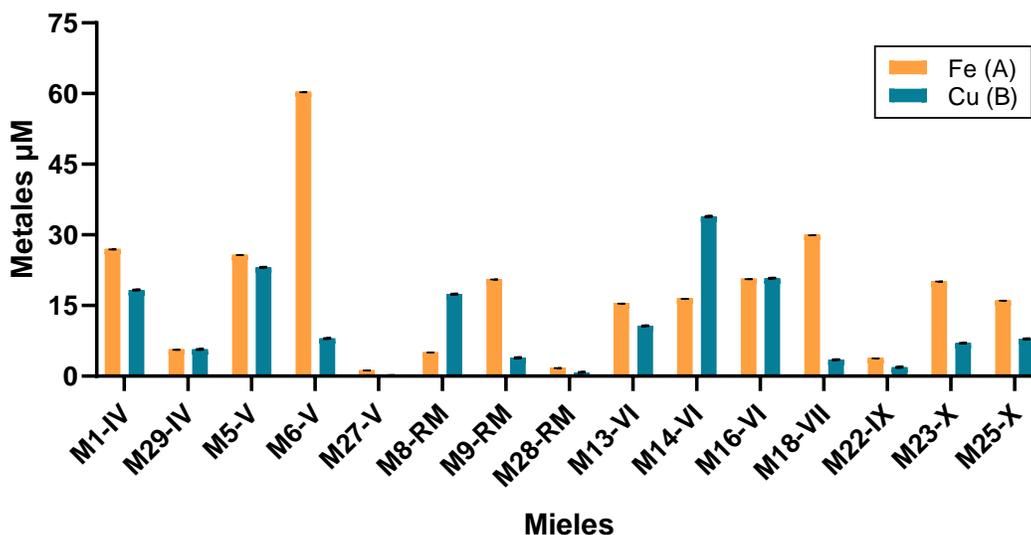


Figura 13. Contenido de (A) hierro y (B) cobre (μM en solución de miel al 20% p/v) en muestras de miel chilenas.

En múltiples regiones del mundo, se observa una prevalencia de mayores concentraciones de hierro en las mieles en comparación con cobre, tal como se detalla en la Tabla 10 con datos de estudios realizados en Turquía, Brasil y Chile. Sin embargo, el contenido de cobre es superior en mieles chilenas incluidas en este estudio a causa de que el país cuenta con reservas que equivalen al 21% del total de reservas del planeta hasta el año 2022, lo que lo convierte en un país rico en este mineral (Servicio Nacional de Geología y Minería (Chile), 2022). En este sentido, las muestras de la zona centro-norte, presentaron mayores concentraciones de cobre que las del sur, dado que los yacimientos de este elemento se encuentran en aquella zona. Por otra parte, el

contenido de cobre encontrado en las mieles del sur es similar a lo reportado por Lobos y col. (2022) en mieles de esta zona.

Tabla 10. Contenido de hierro y cobre en mieles de distintos orígenes alrededor del mundo.

Origen	Promedio metal μM en solución al 20%/ $\mu\text{g/g}$ de miel		Autores
	Fe	Cu	
Chile	$13 \pm 2 / 3,7 \pm 0,5$	$2,4 \pm 0,4 / 0,8 \pm 0,1$	Lobos y col., 2022.
Brasil	$6 \pm 7 / 2 \pm 2$	$1,4 \pm 0,9 / 0,4 \pm 0,3$	Liberato y col., 2013
Turquía	$16 \pm 8 / 5 \pm 2$	$2 \pm 1 / 0,6 \pm 0,5$	Tuzen y col., 2007
Chile	$18 \pm 0,1 / 5,03 \pm 0,03$	$10,9 \pm 0,1 / 3,45 \pm 0,03$	Presente estudio

Los datos presentados anteriormente resaltan la significativa influencia de los metales en la composición de la miel y cómo los recursos naturales del país pueden desempeñar un papel fundamental en su contenido mineral.

Como resultado de estos hallazgos, los experimentos subsiguientes consideraron la adición a las mieles sintéticas y reales de 20 y 50 μM de hierro y 12 y 30 μM de cobre (valores promedio y máximo encontrados en las mieles analizadas). Estos rangos se establecieron para reflejar las condiciones típicas y extremas observadas en las muestras de miel.

7.3 Evaluar el efecto de la dilución, presencia de Fe(III), Cu(II), quelantes metálicos y acción de proteinasa K sobre la generación de H_2O_2 en mieles de la zona centro-sur de Chile

7.3.1 Efecto de la dilución sobre la generación de H_2O_2

El peróxido de hidrógeno es ampliamente reconocido como el principal compuesto antibacteriano presente en la miel, siendo denominado “inhibina” en

términos iniciales antes de que se estableciera su identidad. Como se mencionó previamente, la vía principal de producción de H_2O_2 en la miel se da a través de la síntesis enzimática durante la oxidación de glucosa catalizada por GOx proveniente de las abejas (Brudzynski, 2006). No obstante, existe otra fuente poco explorada de síntesis de H_2O_2 , que es producida por la autooxidación de flavonoides, la que depende de la disponibilidad de oxígeno disuelto que a su vez depende de la dilución de la miel. En la Figura 14, se muestran los resultados de la producción de H_2O_2 en las 15 muestras de miel a diferentes diluciones. Estos resultados fueron relevantes para determinar el porcentaje de dilución óptimo para los siguientes objetivos del estudio.

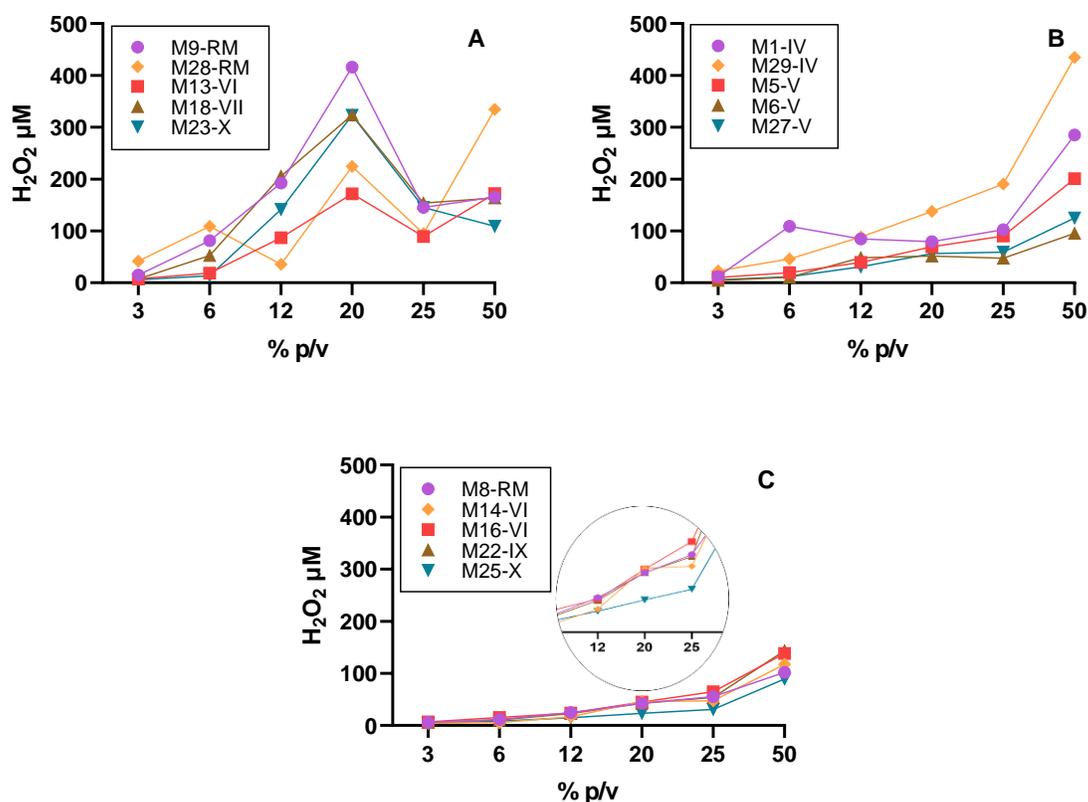


Figura 14. Producción de H_2O_2 a distintas diluciones (% p/v) en mieles con **A)** mayor producción de ROS, **B)** producción intermedia, **C)** producción baja.

El análisis de los datos de la Figura 14 revela interesantes patrones en la producción de peróxido de hidrógeno en distintas muestras de miel. La subdivisión en grupos A, B y C permite identificar mieles con producción de H₂O₂ mayor, intermedia y menor, respectivamente. De manera destacada, se observa que para los tres grupos la mayor producción se encuentra entre el 12 y 20% p/v que corresponde a una condición con mayor acceso al oxígeno disuelto y concentración de los flavonoides presentes en la miel. Este resultado es similar a lo señalado por Brudzynski y col. (2011), quienes reportan que la máxima producción de H₂O₂ se encuentra en mieles diluidas entre el 12 y 25% p/v. Sin embargo, muestras como M29-IV, M5-V, M27-V, M8-RM, M16-VI, M22-IX y M25-X exhibieron un aumento lineal en la generación de H₂O₂ al disminuir la dilución. Este fenómeno se atribuye principalmente a interferencias en el método de determinación, específicamente a la absorbancia por parte de la matriz coloreada a la longitud de onda considerada, más que a la variación intrínseca de la especie reactiva de oxígeno en cuestión.

Como han informado varios autores, las diluciones que maximizan la producción de H₂O₂ también coinciden con una máxima actividad antibacteriana contra diversas cepas bacterianas. Por ejemplo, Henriques y col. (2011) y Ahmadi-Motamayel y col. (2013), informaron que mieles al 20% p/v inhibieron el crecimiento de bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-Negativa) y *Streptococcus mutans* (Gram-Positiva), respectivamente. Así mismo, Brudzynski y col. (2011), encontraron una máxima actividad de la miel diluida al 12,5% p/v contra *E. coli* y *B. subtilis*.

Estos hallazgos se complementan también con la investigación reciente de Brudzynski (2023), quien destaca que la producción de la especie reactiva de oxígeno de interés en este estudio no siempre sigue una relación lineal con las

diluciones de la miel. Más bien, está influenciada por otros factores, como la presencia de cationes de hierro y cobre. Además, señala una relación entre el color de la miel y la generación de H_2O_2 . Mielés más oscuras logran generar cantidades importantes de H_2O_2 a diluciones mayores (6-12% p/v), mientras que las mieles más claras mostraron una producción significativa solamente a porcentajes menores de dilución (25-50% p/v).

Como se señaló previamente, debido a que el color de la miel diluida es similar al del cromóforo usado en la determinación de H_2O_2 mediante espectroscopía UV-Vis (o-dianisidina oxidada); diluciones mayores o iguales al 25% p/v presentan menor interferencia en esta determinación. En este sentido, los resultados mostrados anteriormente respaldan la elección de la dilución del 20% p/v como óptima para la producción de peróxido de hidrógeno en las muestras de miel, proporcionando una base sólida para la investigación.

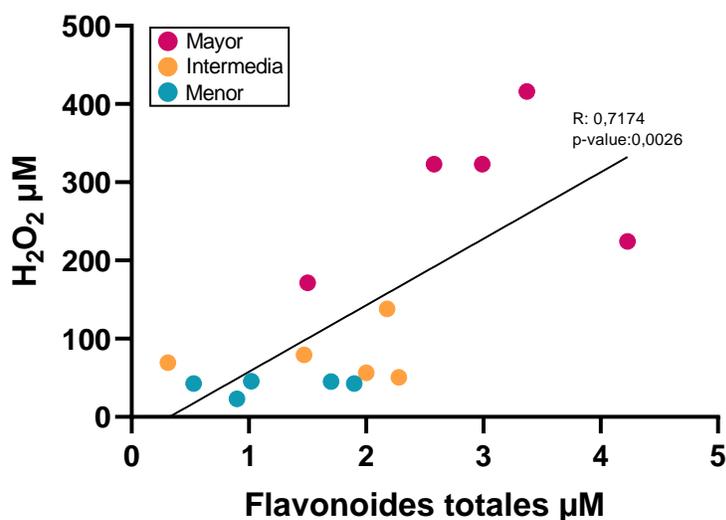


Figura 15. Relación entre la generación de peróxido de hidrógeno y la concentración total de los flavonoides evaluados en la miel diluida al 20% p/v.

Por otra parte, como se presenta en la Figura 15, se observó una correlación significativa ($R = 0,7174$; $p = 0,0026$) entre la generación de peróxido de hidrógeno y la concentración total de los flavonoides evaluados en la miel diluida al 20% p/v; con una relación molar aproximada de 100:1. Esto demuestra la relevancia de estos componentes en la capacidad de generar ROS en la miel.

7.3.2 Relación multifactorial entre los flavonoides, hierro y cobre de la miel y su generación de H_2O_2

Los métodos quimiométricos comprenden un conjunto de herramientas estadísticas y matemáticas aplicadas al análisis de datos químicos. Su principal propósito es extraer información relevante y obtener un mayor entendimiento de sistemas químicos complejos, como es el caso de la miel. En este contexto, resulta crucial emplear esta herramienta para manejar el conjunto de datos y así describir de manera integral el efecto de los flavonoides y metales sobre la generación de H_2O_2 . Para ello, se utilizó la técnica de regresión PLS con el fin de establecer relaciones entre múltiples variables independientes (predictoras) y una o más variables dependientes (respuesta). En este caso, se buscó maximizar la covarianza entre las variables predictoras (concentración de flavonoides y metales) y la respuesta (generación de H_2O_2), facilitando la modelación de la relación entre estas variables de manera efectiva. Para ello se estandarizaron las variables predictoras dándoles así el mismo peso independiente de su concentración para evitar que aquellas con magnitud más grande dominen el modelo.

La Figura 16 representa al gráfico de los coeficientes de regresión del modelo PLS ajustado, donde los valores indicados para cada factor indican su contribución a la producción de H_2O_2 , reflejando el cambio en la respuesta

asociado a un cambio de una unidad en la variable predictora correspondiente, manteniendo las demás constantes.

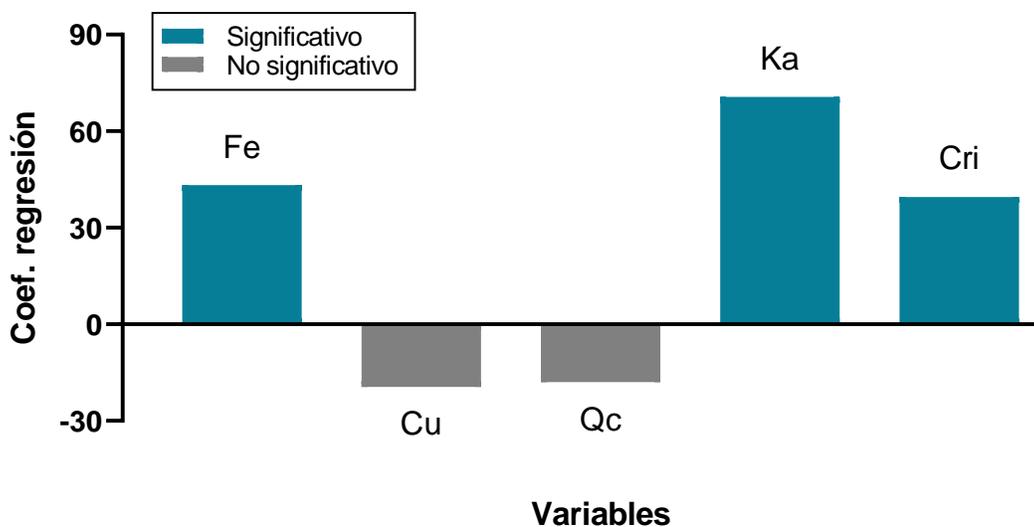


Figura 16. Coeficientes de regresión PLS para el modelo multivariable que describe la generación de H_2O_2 en mieles reales.

Los flavonoides miricetina y apigenina fueron excluidos debido a su poca representatividad por estar presentes en un número reducido de las mieles analizadas (tres y dos, respectivamente). Se observa que el hierro, kaempferol y crisina tienen un efecto positivo sobre la producción de H_2O_2 ; donde destaca entre los flavonoides el kaempferol por su mayor influencia. En contraste, el cobre y la quercetina muestran un efecto negativo, aunque no significativo. La relación observada entre los metales, los flavonoides y la generación de H_2O_2 en el modelo de regresión es similar a los resultados reportados por Faúndez y col. (2023). Se reafirma así el rol de estos componentes en la actividad antioxidante y/o prooxidante de la miel. Kaempferol y crisina en conjunto con Fe(III) contribuyen a la producción de H_2O_2 en un mecanismo que incluiría la formación de un complejo, la posterior oxidación intramolecular de este y luego

una serie de reacciones que llevan a la generación de especies reactivas de oxígeno (Figura 17).

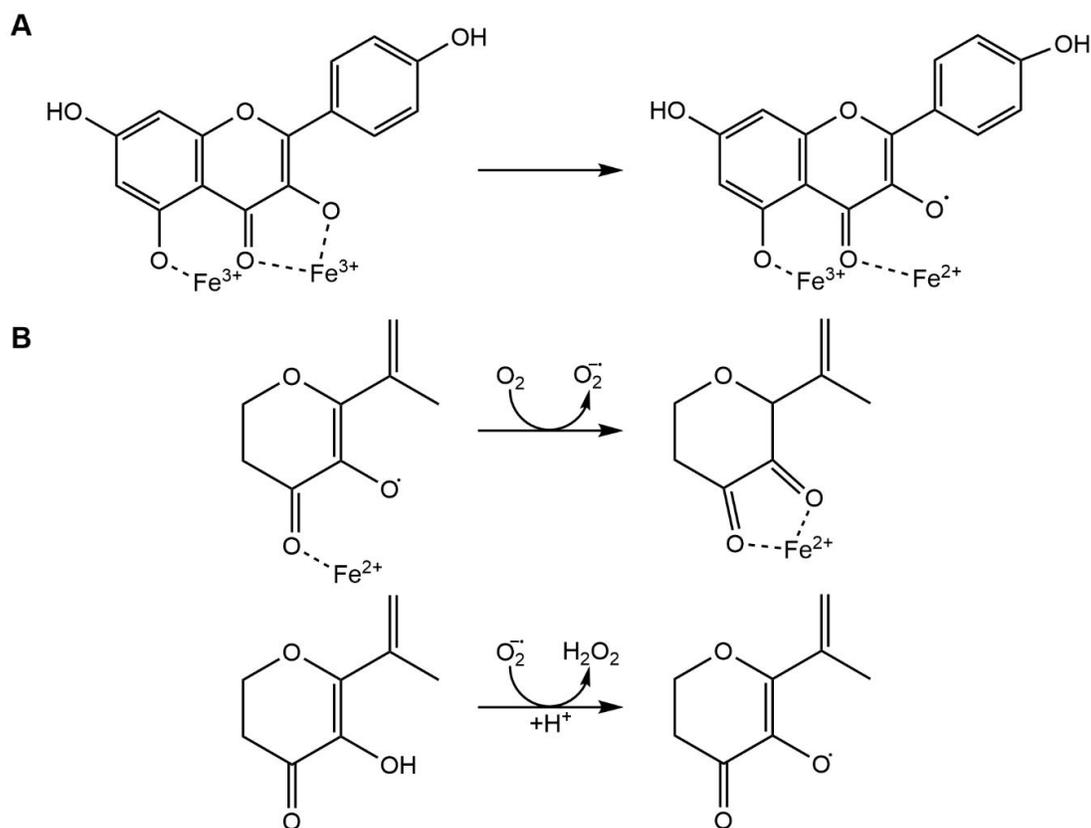


Figura 17. A) Complejación entre Fe^{3+} y kaempferol y posterior reacción redox intramolecular y **B)** Mecanismo de la actividad prooxidante con la generación de ROS.

Por otro lado, la quercetina y el cobre exhiben coeficientes de regresión negativos, indicando una relación inversa con la producción de H_2O_2 . Este hallazgo apunta a una posible función antioxidante, contrarrestando la generación de especies reactivas de oxígeno. Estos resultados concuerdan con estudios previos, como el realizado por Bukhari y col. (2009), quienes señalan que el complejo Cu-quercetina exhibe actividad antioxidante superior en comparación con la quercetina pura, respaldando la idea de que los iones metálicos como el Cu(II) alteran las propiedades químicas de la quercetina,

fortaleciendo su capacidad antioxidante. El mecanismo que operaría en este caso se presenta en la Figura 18, con una primera etapa de complejación y posterior reacción con un radical.

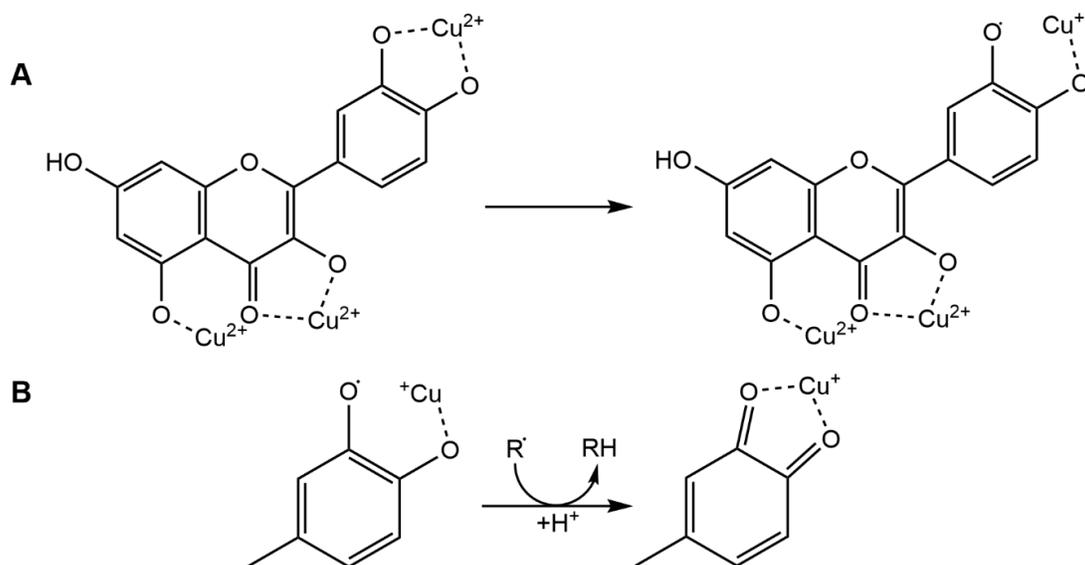


Figura 18. A) Sitios de complejación entre Cu^{2+} y quercetina para actuar como antioxidante y B) mecanismo de actividad antioxidante.

En resumen, la combinación de los resultados indica una compleja interacción entre los metales y los flavonoides, sugiriendo que algunos podrían actuar como antioxidantes, mientras que otros poseen un papel prooxidante.

7.3.3 Efecto de Fe(III), Cu(II), quelantes metálicos y acción de proteinasa K sobre la generación de H_2O_2

Se evaluó el efecto de distintos factores sobre la generación de peróxido de hidrógeno en las muestras de miel diluidas al 20% p/v: Los cationes Fe(III) y Cu(II) a $50 \mu\text{M}$ y $30 \mu\text{M}$, respectivamente; como posibles inductores de ROS; el complejante EDTA a $200 \mu\text{M}$ como quelante de cationes inductores de ROS y proteinasa K a $1,5 \text{ U/mL}$ para eliminar la acción de GOx y visualizar la

generación de peróxido de hidrógeno atribuible solo a autooxidación de los flavonoides. En la Figura 19 se presenta el resultado obtenido.

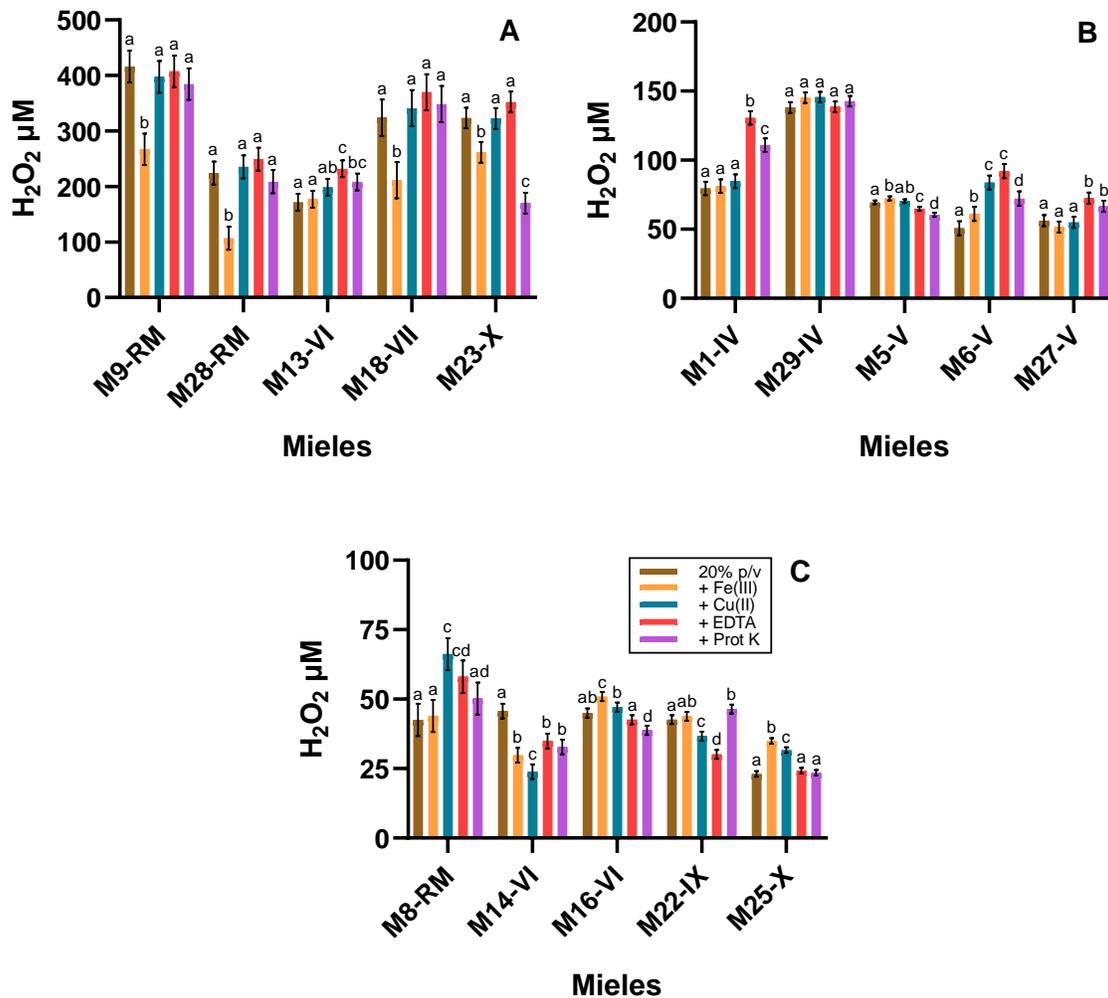


Figura 19. Producción de H₂O₂ en mieles reales al 20% p/v en presencia de Fe(III) 50 µM, Cu(II) 30 µM, EDTA 200 µM y proteinasa K 1,5 U/mL; con **A)** mayor producción de ROS, **B)** producción intermedia y **C)** producción baja.

Tal como había sido presentando en el punto anterior, todas las mieles generaron H₂O₂ en cantidad variable a la dilución 20% p/v, lo que puede ser atribuido a la autooxidación de flavonoides luego de 3 horas de incubación y/o

a la acción de la GOx. Al evaluar los efectos cada uno de los factores sobre esta generación se observó lo siguiente:

Fe(III): Como se presentó en la relación multifactorial, el hierro propio de la miel tiene un efecto positivo sobre la generación de H₂O₂. Sin embargo, el Fe(III) extra añadido produjo en general una disminución de la generación de H₂O₂ en las mieles de alta producción (Figura 19A). Este efecto es atribuible a la transformación de H₂O₂ a radical hidroxilo debido a una reacción Fenton con Fe(II) formado por la reducción de Fe(III) por parte de los flavonoides o a la formación de complejos con capacidad antioxidante. En las mieles de producción intermedia y baja (Figura 19 B y C, respectivamente) no tuvo efecto, atribuible a la menor concentración de flavonoides que poseen estas mieles y por ello con menor posibilidad de que ocurra lo antes mencionado.

Cu(II): Salvo en algunas mieles de producción intermedia y baja, donde generó un incremento en la generación de H₂O₂, atribuible a la formación de complejos que estimulan la autooxidación de los flavonoides, en el resto no tuvo un efecto significativo. Este resultado es similar al observado en la relación multifactorial donde el efecto de cobre presente en la miel no fue significativo.

EDTA: Al igual que Cu(II), solo en algunas mieles de producción intermedia y baja generó un aumento en la generación de H₂O₂. Este incremento puede deberse a la complejación de cationes metálicos por parte de este quelante, dejándolos disponibles para su complejación con los flavonoides, potenciando así su autooxidación (Brudzynski, 2023).

Proteinasa K: En la mayoría de las muestras produjo un efecto significativo, pero sin una tendencia. En las muestras M5-V, M14-VI, M16-VI y M23-X se observó una disminución y por ende un aporte importante de la GOx. En los

casos en que la generación aumentó se atribuye a una acción quelante de la proteína similar a EDTA.

Para tener una idea más clara del efecto de Fe(III) y Cu(II) sobre la autooxidación de los flavonoides y generación de H₂O₂, se realizaron distintos ensayos en mieles sintéticas como modelo simplificado de estudio, para poder evaluar el efecto de cada flavonoide por separado.

7.4 Evaluar la generación de peróxido de hidrógeno por autooxidación de los flavonoles y flavonas en medio de miel sintética en ausencia y presencia de Fe(III) y Cu(II)

Los flavonoides son compuestos de gran importancia dietética y pueden clasificarse en diferentes categorías, entre las cuales se destacan los flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanoles, flavanonas y antocianinas. Esta clasificación se debe al carbono del anillo C al que se une el anillo B, así como al grado de insaturación y oxidación del anillo C. Los flavonoides exhiben una amplia gama de efectos biológicos, siendo reconocidos por su efecto antibacteriano, como se ha señalado en estudios anteriores (Pyrzynska & Biesaga, 2009; Brudzynski, 2023).

En el presente estudio se determinaron en la miel las flavonas crisina y apigenina y los flavonoles kaempferol, quercetina y miricetina. La estructura química de estos compuestos se presentó en la Tabla 1. Sin embargo, con la finalidad de destacar la disposición y número de los grupos hidroxilo en las moléculas ordenados de menor a mayor cantidad, estas se presentan nuevamente en la Figura 20.

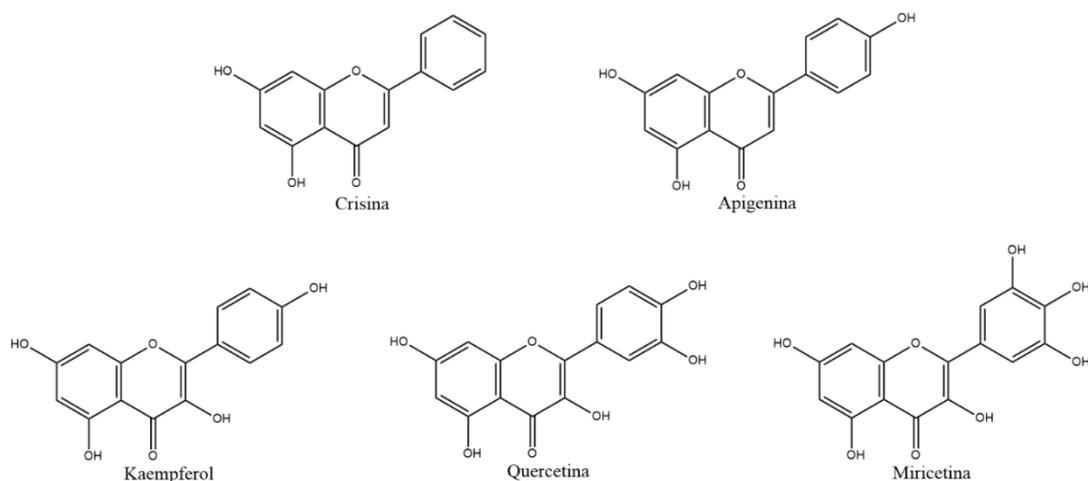


Figura 20. Estructura química flavonas y flavonoles determinados en el presente estudio en mieles chilenas.

Dada la relevancia de los flavonoides en la generación de peróxido de hidrógeno en la miel (Figura 15); se evaluó la generación de esta ROS por la acción prooxidante de los cinco flavonoides seleccionados en forma individual, en medio de miel sintética al 20% p/v, en presencia de Fe(III) y Cu(II); como un modelo simplificado de estudio. Para ello se eligieron concentraciones entre 25 y 200 μM de cada flavona y flavonol, en ausencia y presencia de Fe(III) (20 y 50 μM) y Cu(II) (12 y 30 μM). Cabe destacar que estas concentraciones son entre 10 y 100 veces la concentración promedio total de los flavonoides encontrados en las mieles de este estudio al diluirlas al 20% p/v; mientras que las concentraciones de Fe(III) y Cu(II) corresponde a las encontradas en las mieles a esa misma dilución.

7.4.1 Generación de H_2O_2 por crisina y apigenina en presencia de Fe(III) y Cu(II)

La Tabla 11 presenta el ANOVA multivía de la generación de H_2O_2 para distintas concentraciones de las flavonas crisina y apigenina y de los cationes Fe(III) y Cu(II). Se observa que ambos factores tienen un efecto significativo

sobre la generación de H₂O₂, al igual que la interacción entre ambos factores (p < 0,01). Esto demuestra que tanto la concentración de las flavonas como de los metales influye de manera significativa en la producción de peróxido de hidrógeno y que son interdependientes. Sin embargo, el efecto de las flavonas es mucho mayor, de acuerdo al valor de F.

Tabla 11. Análisis de varianza para la generación de H₂O₂ influenciada por flavonas, Fe³⁺ y Cu²⁺.

Flavona	Fuentes de variación	Fe(III)		Cu(II)	
		F-Ratio	P-Value	F-Ratio	P-Value
Crisina	Concentración Cri	994	<0,01	544	<0,01
	Concentración Metal	21	<0,01	22	<0,01
	Interacción Cri-Metal	6	<0,01	4	<0,01
Apigenina	Concentración Ap	804	<0,01	825	<0,01
	Concentración Metal	15	<0,01	15	<0,01
	Interacción Ap-Metal	9	<0,01	23	<0,01

El test HSD Tukey de intervalos múltiples para comparar y ver con mayor detalle el efecto de las concentraciones de Fe(III) y Cu(II) sobre la generación de peróxido por parte de la crisina se presenta en la Figura 21 A y B. Tanto para el hierro (Figura 21A) como para el cobre (Figura 21B), se observa que solo a la concentración mayor hay un incremento significativo en la generación del peróxido. Esto podría asociarse a una menor sensibilidad de la crisina a la presencia de Fe(III) y Cu(II) ya que carece de la estructura propicia para la complejación de estos cationes (Figura 20) y con ello estimular su oxidación y generación de H₂O₂.

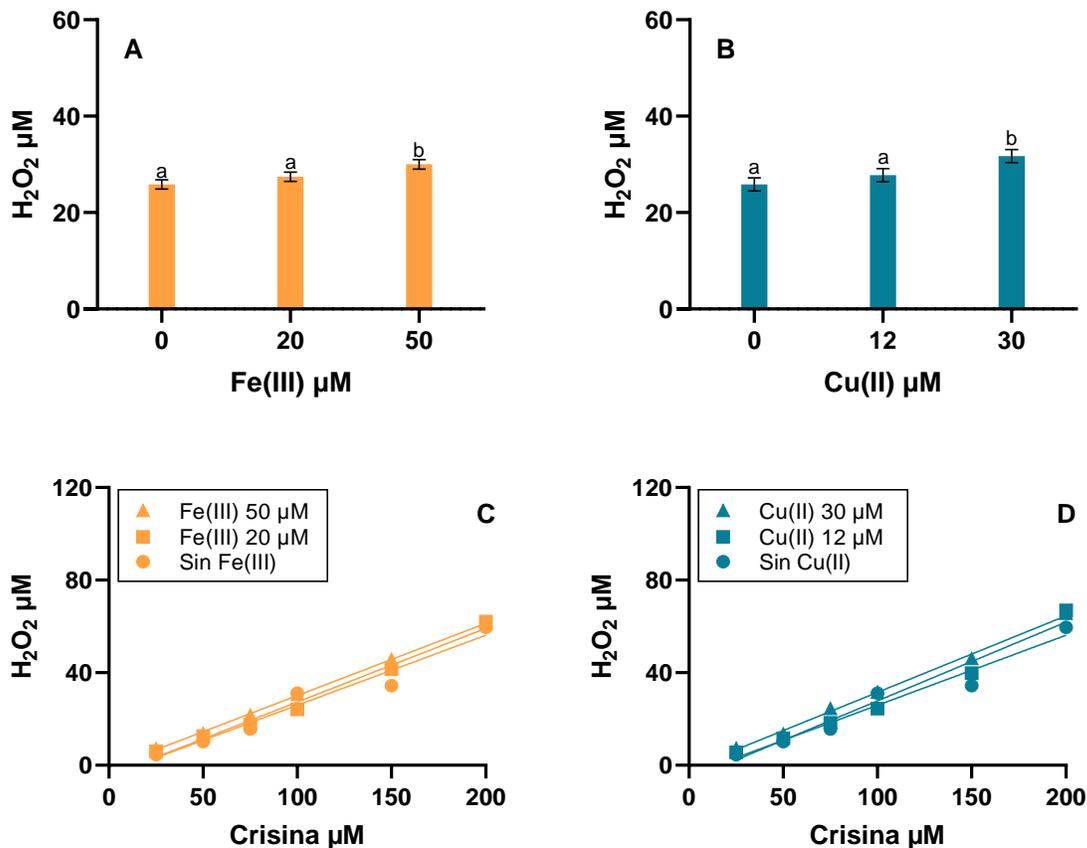


Figura 21. Producción de H₂O₂ en presencia de crisina a distintas concentraciones de **A)** Fe(III), **B)** Cu(II), **C)** crisina-Fe y **D)** crisina-Cu.

Por otra parte, en la Figura 21 C y D, se observa el efecto ascendente lineal en la generación de peróxido de hidrógeno a medida que aumenta la concentración de crisina en ausencia y presencia de los cationes; siendo en este último caso el incremento en la producción levemente mayor, pero significativo según lo indicado en el test Tukey. En la Tabla 12, se presenta el valor de pendiente y coeficiente de determinación (R^2) para la relación lineal entre la concentración de crisina y la generación de H₂O₂ en ausencia y presencia de los cationes, demostrando el buen ajuste a este modelo. Además, los resultados indican que por cada mol de crisina, se generan aproximadamente 0,30 moles de peróxido

de hidrógeno en ausencia de metales, valor que incrementa levemente al adicionar cualquiera de los dos metales.

Tabla 12. Regresión lineal crisina-Fe y crisina-Cu.

Flavona	Regresión lineal	Sin Metal	Fe(III) 20 μ M	Fe(III) 50 μ M	Cu(II) 12 μ M	Cu(II) 30 μ M
Crisina	Pendiente	0,3026	0,3184	0,3121	0,3402	0,3305
	R ²	0,9542	0,9846	0,9993	0,9704	0,9960

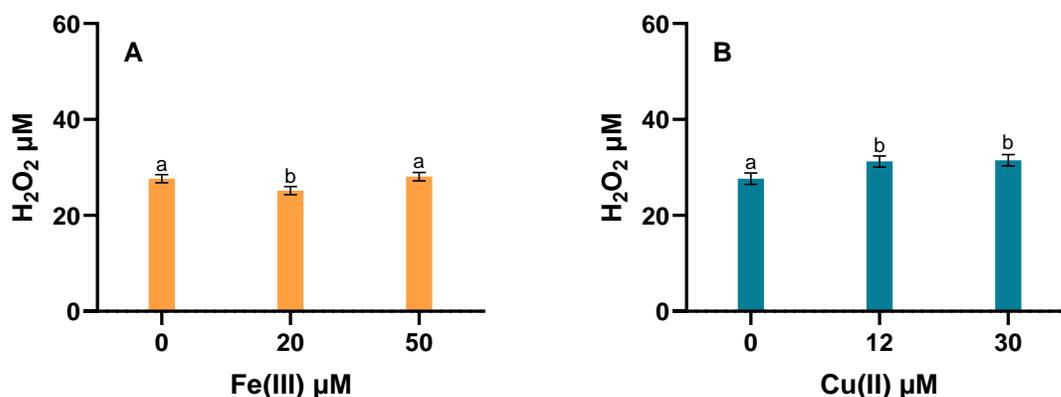


Figura 22. Producción de H₂O₂ en presencia de apigenina a distintas concentraciones de **A)** Fe(III) y **B)** Cu(II).

De igual forma, el test HSD Tukey de intervalos múltiples para comparar y ver con mayor detalle el efecto de las concentraciones de Fe(III) y Cu(II) sobre la generación de peróxido por parte de la apigenina se presenta en la Figura 22 A y B. Se observa que solo la presencia de Cu(II) produce un incremento significativo en la generación de peróxido y que disminuye en presencia de Fe(III) 20 μ M. Como en el caso de la crisina, esto podría asociarse a que la apigenina carece de la estructura propicia para la complejación de estos cationes (Figura 20) y con ello estimular su oxidación y generación de H₂O₂; mientras que el efecto de Fe(III) se podría deber a la transformación del H₂O₂ a radical

hidroxilo debido a una reacción Fenton con Fe(II) formado por reducción de Fe(III) por parte de la apigenina.

Al igual que crisina, se observó un efecto ascendente lineal en la generación de peróxido de hidrógeno a medida que aumenta la concentración de apigenina en ausencia y presencia de los cationes. En la Tabla 13 se presenta el valor de pendiente y coeficiente de determinación (R^2) para la relación lineal entre la concentración de apigenina y la generación de H_2O_2 en ausencia y presencia de los cationes, demostrando el buen ajuste a este modelo. En este caso se producen aproximadamente 0,27 moles de H_2O_2 por cada mol de apigenina en ausencia de metal. Esta relación se ve incrementada solamente por la presencia de Cu(II) y disminuida en presencia de Fe(III), lo cual puede estar atribuido a la transformación del H_2O_2 a radical hidroxilo producto de una reacción Fenton como ya se mencionó previamente.

Tabla 13. Regresión lineal apigenina-Fe y apigenina-Cu.

Flavona	Regresión lineal	Sin	Fe(III)	Fe(III)	Cu(II)	Cu(II)
		Metal	20 μ M	50 μ M	12 μ M	30 μ M
Apigenina	Pendiente	0,2749	0,2602	0,2186	0,4248	0,3376
	R^2	0,9569	0,9912	0,9781	0,9512	0,9775

Aunque las flavonas poseen estructuras químicas que difieren en la presencia de un grupo hidroxilo, muestran una relación similar en la producción de H_2O_2 . Esto se evidencia al observar que, en ausencia de metal, prácticamente mantienen la misma relación de generación de peróxido de hidrógeno (0,3 moles por mol de flavonoide) la cual apenas varía en presencia de Fe(III) y Cu(II).

7.4.2 Generación de H₂O₂ por kaempferol, quercetina y miricetina en presencia de Fe(III) y Cu(II)

La Tabla 14 presenta el ANOVA multivía de la generación de H₂O₂ para distintas concentraciones de los flavonoles kaempferol, quercetina y miricetina en presencia de Fe(III) y Cu(II). Los resultados muestran que tanto la concentración de los flavonoles como de los cationes, así como la interacción entre ambos, tienen un efecto significativo sobre la producción de peróxido de hidrógeno. Esto demuestra que la presencia de los metales influye de manera significativa en la producción de peróxido de hidrógeno en combinación con los flavonoles. Además, en este caso y a diferencia de lo observado para las flavonas, la presencia de los cationes es tan relevante como la de los flavonoles de acuerdo al valor F.

Tabla 14. Análisis de varianza para la generación de H₂O₂ influenciada por flavonoles, Fe³⁺ y Cu²⁺.

Flavonol	Fuentes de variación	Fe(III)		Cu(II)	
		F-Ratio	P-Value	F-Ratio	P-Value
Kaempferol	Concentración Ka	920	<0,01	1606	<0,01
	Concentración Metal	305	<0,01	606	<0,01
	Interacción Ka-Metal	55	<0,01	32	<0,01
Quercetina	Concentración Qc	1809	<0,01	1235	<0,01
	Concentración Metal	790	<0,01	1288	<0,01
	Interacción Qc-Metal	35	<0,01	53	<0,01
Miricetina	Concentración Mi	1865	<0,01	3474	<0,01
	Concentración Metal	5274	<0,01	29064	<0,01
	Interacción Mi-Metal	250	<0,01	344	<0,01

El test HSD Tukey de intervalos múltiples para comparar el efecto de las concentraciones de Fe(III) y Cu(II) sobre la generación de peróxido por parte

del kaempferol se presenta en la Figura 23 A y B. En esta, se observa un incremento en la producción de H_2O_2 tanto al agregar hierro como cobre, siendo similar para ambas concentraciones de hierro y con una disminución para la mayor concentración de cobre. A diferencia de lo observado para las flavonas, kaempferol presenta la estructura propicia para la complejación de Fe(III) y Cu(II) (Figura 20) por lo cual, consecuentemente estimula la generación de H_2O_2 .

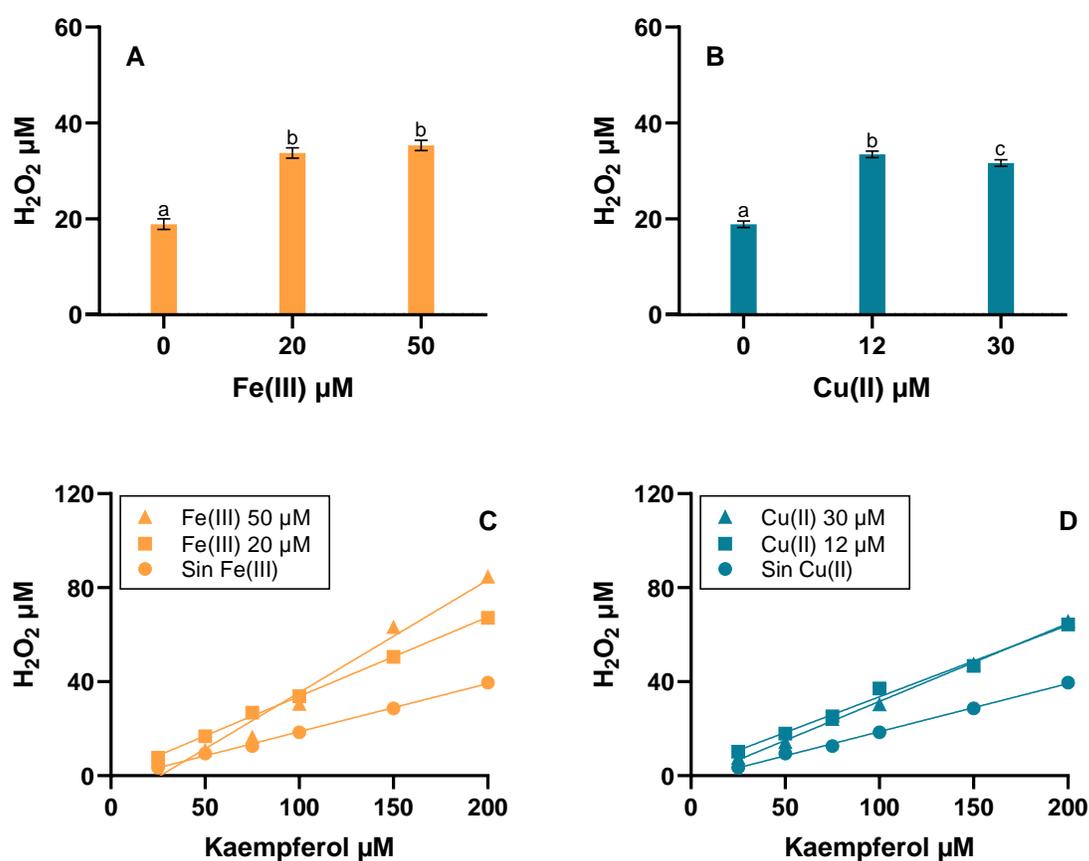


Figura 23. Producción de H_2O_2 en presencia de kaempferol a distintas concentraciones de **A)** Fe(III), **B)** Cu(II), **C)** kaempferol-Fe y **D)** kaempferol-Cu.

En la Figura 23 C y D, se aprecia claramente el efecto ascendente lineal en la generación de peróxido de hidrógeno a medida que aumenta la concentración

de kaempferol, en ausencia y presencia de ambos cationes. En la Tabla 15 se presenta el valor de pendiente y coeficiente de determinación (R^2) para la relación lineal entre la concentración de kaempferol y la generación de H_2O_2 en ausencia y presencia de los cationes, demostrando el buen ajuste a este modelo. Se puede observar que en presencia de Fe(III) los moles H_2O_2 producidos por mol de kaempferol aumentan progresivamente a más del doble (0,20 a 0,48), notando un efecto positivo con la adición del metal. Para el caso del Cu(II), este incremento es cercano al 50% (0,20 a 0,33).

Tabla 15. Regresión lineal kaempferol-Fe y kaempferol-Cu.

Flavonol	Regresión lineal	Sin Metal	Fe(III) 20 μM	Fe(III) 50 μM	Cu(II) 12 μM	Cu(II) 30 μM
Kaempferol	Pendiente	0,2049	0,3369	0,4788	0,3042	0,3319
	R^2	0,9976	0,9988	0,9717	0,9910	0,9980

El test HSD Tukey de intervalos múltiples para comparar el efecto de las concentraciones de Fe(III) y Cu(II) sobre la generación de peróxido por parte de la quercetina se presenta en la Figura 24 A y B. Se observa un aumento progresivo en la concentración de H_2O_2 por parte de la quercetina en combinación con cobre o hierro. Además, se aprecia un incremento significativo en la generación de H_2O_2 en la medida que se incrementa la concentración de metal en el medio, siendo este mayor en el caso del cobre. Al igual que kaempferol, quercetina presenta la estructura propicia para la complejación de Fe(III) y Cu(II) (Figura 20) y consecuentemente estimular la generación de H_2O_2 .

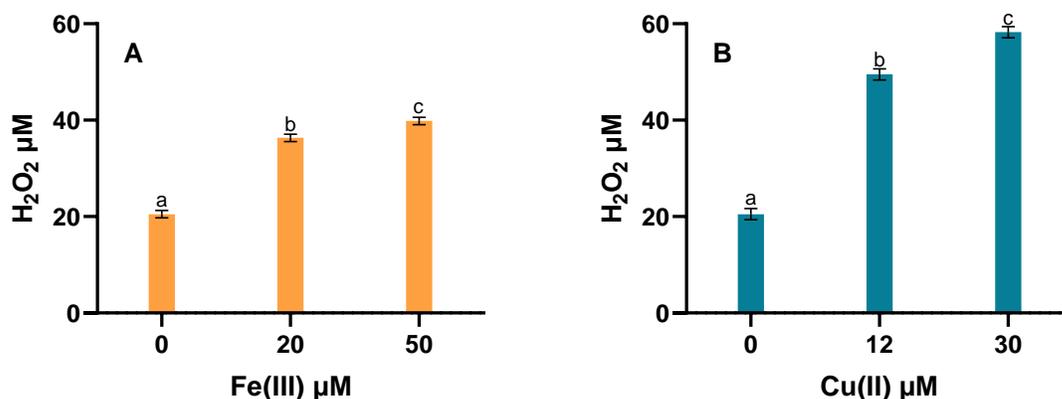


Figura 24. Producción de H₂O₂ en presencia de quercetina a distintas concentraciones de **A)** Fe(III) y **B)** Cu(II).

En la Tabla 16 se presenta el valor de pendiente y coeficiente de determinación (R^2) para la relación lineal entre la concentración de quercetina y la generación de H₂O₂ en ausencia y presencia de los cationes, demostrando el buen ajuste a este modelo. La quercetina en presencia de Cu(II) genera más peróxido de hidrógeno que en presencia de Fe(III). A concentraciones máximas de los metales, los moles de H₂O₂ producidos por mol de quercetina aumentan al doble con cobre (0,25 a 0,53) y en un 50% con hierro (0,25 a 0,39).

Tabla 16. Regresión lineal quercetina-Fe y quercetina-Cu.

Flavonol	Regresión lineal	Sin Metal	Fe(III) 20 µM	Fe(III) 50 µM	Cu(II) 12 µM	Cu(II) 30 µM
Quercetina	Pendiente	0.2503	0.3739	0.3867	0.4778	0.5298
	R^2	0,9934	0,9871	0,9989	0,9965	0,9984

El test HSD Tukey de intervalos múltiples para comparar el efecto de la concentración de Fe(III) y Cu(II) sobre la generación de peróxido por parte de la miricetina se presenta en la Figura 25 A y B. Al igual que lo observado con

la quercetina, existe un aumento progresivo en la concentración de H_2O_2 por parte de la miricetina en combinación con Cu(II) o Fe(III) .

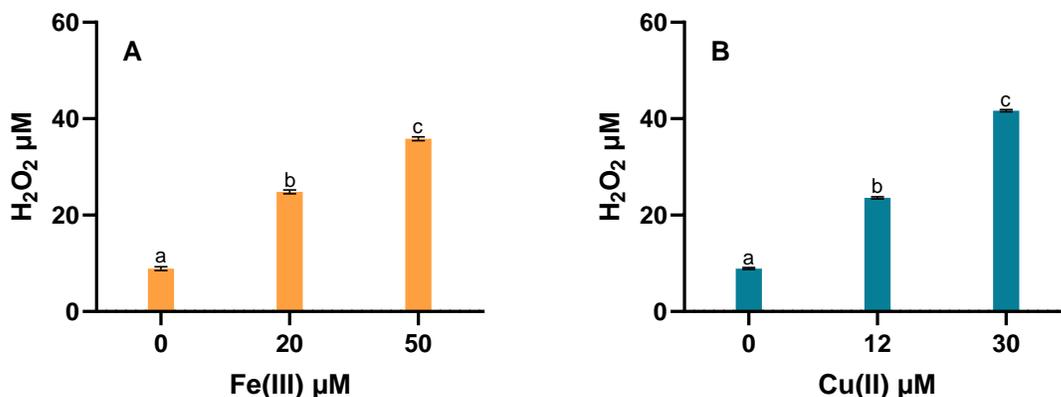


Figura 25. Producción de H_2O_2 en presencia de miricetina a distintas concentraciones de **A)** Fe(III) y **B)** Cu(II) .

La miricetina en ausencia de metales, produce cantidades muy pequeñas de H_2O_2 (por cada 1 mol de miricetina se produce aproximadamente 0,07 mol de H_2O_2). Sin embargo, se observa un incremento progresivo hasta 4 veces al añadir Fe(III) 50 μM y 2,5 veces al añadir Cu(II) 30 μM . Entre todos los flavonoides estudiados, miricetina presenta la estructura más propicia para la complejación de Fe(III) y Cu(II) (Figura 20) y consecuentemente es la que incrementa más la generación de H_2O_2 por autooxidación en presencia de estos cationes.

Al igual que en todos los flavonoides anteriores, los valores de R^2 para la relación lineal entre la concentración de miricetina y la generación de H_2O_2 en ausencia y presencia de los cationes indican un buen ajuste al modelo (Tabla 17), con un valor más bajo (0,8642) al añadir Cu(II) 30 μM .

Tabla 17. Regresión lineal miricetina-Fe y miricetina-Cu.

Flavonol	Regresión lineal	Sin Metal	Fe(III) 20 μM	Fe(III) 50 μM	Cu(II) 12 μM	Cu(II) 30 μM
Miricetina	Pendiente	0.0680	0.1613	0.2888	0.1023	0.1805
	R ²	0,9894	0,9995	0,9949	0,9434	0,8642

A partir de estos resultados, es evidente la relevancia de la estructura química de los flavonoides para la formación de complejos con Fe(III) y Cu(II), el consecuente estímulo de su autooxidación y la generación de H₂O₂. En la medida que la molécula presenta un mayor número de grupos hidroxilo en posición adecuada para la coordinación de los cationes para formar complejos, mayor es la generación de H₂O₂ por los mecanismos ya mencionados (Figura 7). Sin embargo, es sabido que un mayor número de grupos hidroxilo en los flavonoides se asocia igualmente a una mayor actividad antioxidante (Procházková y col., 2011). Una combinación de estos mecanismos se presentaría en las mieles, dando como resultado una acción prooxidante o antioxidante neta.

7.4.3 Comparación de la generación de H₂O₂ por los distintos flavonoides estudiados

Se realizó una comparación de la generación de H₂O₂ entre los cinco flavonoides estudiados, a la máxima concentración evaluada (200 μ M), en ausencia y presencia de hierro 50 μ M y cobre 30 μ M. En la Figura 26 se muestra el resultado.

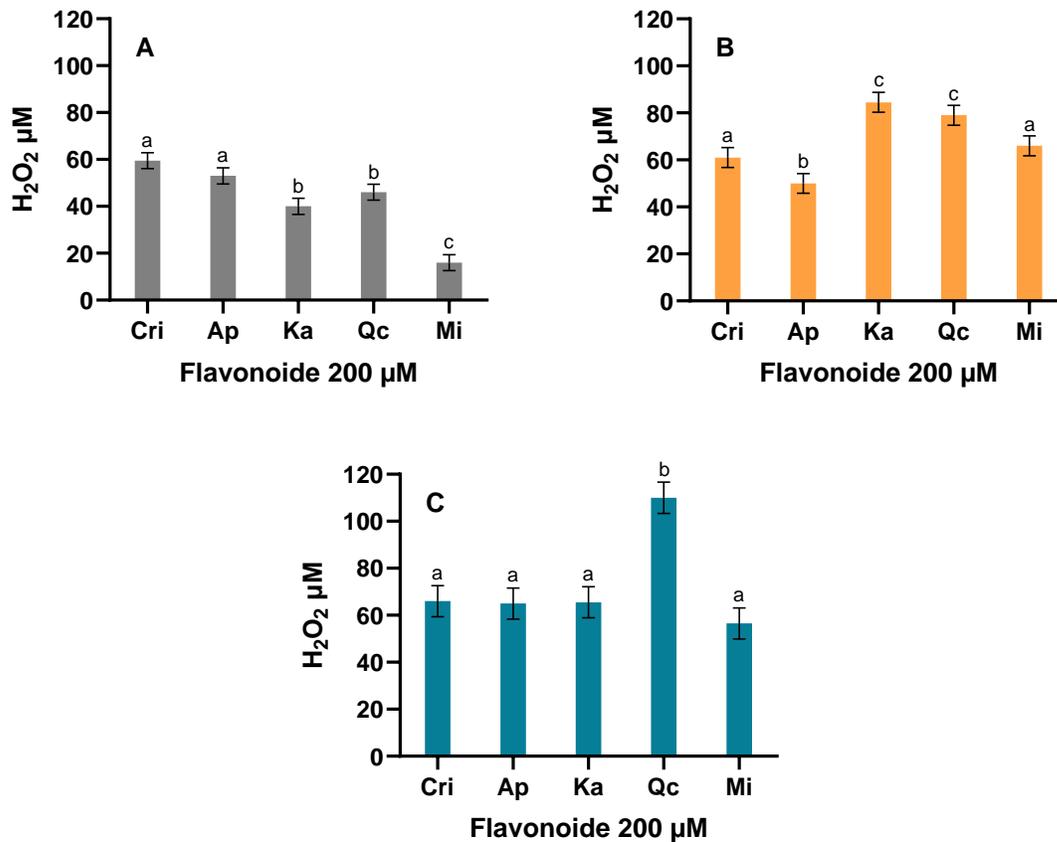


Figura 26. Producción de H₂O₂ en presencia de flavonoides a 200 µM **A)** sin metal, **B)** con hierro 50 µM y **C)** con cobre 30 µM.

Como se presentó previamente, en ausencia de los cationes (Figura 26A) todos los compuestos presentan autooxidación y la consecuente generación de H₂O₂. Las flavonas crisina y apigenina presentan una generación de H₂O₂ (aproximadamente 60 µM), significativamente superior (p<0,05) a la de los flavonoles kaempferol y quercetina (aproximadamente 40 µM) que a su vez es significativamente mayor (p<0,05) que la generación por parte de miricetina (aproximadamente 20 µM). En presencia de Fe(III) (Figura 26B) se invierte la relación debido a que para los flavonoles se incrementa la generación de H₂O₂, mientras que en presencia de Cu(II) (Figura 26C) el incremento se produce para

quercetina y miricetina (aunque esta última no supera la generación de las flavonas).

Tanto las flavonas como los flavonoles generan H_2O_2 por autooxidación y en ambos casos este se incrementa al añadir los metales. Sin embargo, este incremento es solo marginal y supeditado a concentraciones menores en el caso de las flavonas; mientras que es mucho más evidente en los flavonoles. Como ya se mencionó previamente, esto puede estar relacionado con la estructura que favorece la complejación de los cationes y cataliza así la oxidación del flavonoide como indica Miura y col. (1998): estructura o-dihidroxi en el anillo B; doble enlace de 2,3 en conjugación con un grupo 4-oxo en el anillo C y finalmente, grupos 3- y 5-OH con un grupo 4-oxo en los anillos A y C, respectivamente (Figura 6). En el caso de las flavonas solo se cumple con el doble enlace de 2,3 en conjugación con un grupo 4-oxo del anillo C, por lo cual cabría esperar una producción de H_2O_2 menor. A diferencia de estas, los flavonoles poseen como mínimo dos de los tres criterios estructurales para actuar como prooxidantes, por lo cual el incremento observado en la cantidad de peróxido de hidrógeno generado en presencia de Fe(III) y Cu(II) es consistente con lo indicado anteriormente. La quercetina, cumple con los tres criterios estructurales y genera la mayor cantidad de peróxido de hidrógeno con metales. El kaempferol, cumple con dos de los tres criterios estructurales y produce en segundo lugar la mayor cantidad de H_2O_2 en presencia de metales. La miricetina también cumple con los tres criterios estructurales y fue la que presentó un mayor incremento en la generación de H_2O_2 en presencia de Fe(III) y Cu(II). Sin embargo, el grupo pirogalol del anillo B en su estructura favorece la actividad antioxidante y limita la producción de peróxido de hidrógeno.

La variación en la generación de H₂O₂ podría estar relacionada igualmente con las constantes de formación de los complejos formados entre los flavonoides y los cationes Fe(III) y Cu(II). En la Tabla 18 se presentan las constantes de formación reportadas entre kaempferol, quercetina y miricetina con Fe(III) a pH = 4 (el promedio de la miel).

Tabla 18. Constantes de formación entre flavonoles y Fe(III) a pH = 4.

Complejo	M:L	logK	Autores
Fe³⁺- Ka	1:1	3,35	Dimitrić y col., 2014.
Fe³⁺- Qc	1:2	9,56	Marković y col., 2011.
Fe³⁺- Mi	1:2	9,40	Sungur & Uzar, 2008.

Si bien la estequiometría es distinta, estos valores indican una mayor estabilidad de los complejos formados entre Fe(III) y quercetina o miricetina que con kaempferol; lo que explicaría los mayores incrementos en la generación de H₂O₂ por parte de los dos primeros en presencia de este catión.

7.4.4 Comparación de la generación de H₂O₂ en mieles sintéticas y reales

Se comparó la producción de H₂O₂ entre las 15 mieles reales al 20% p/v y sus correspondientes mieles sintéticas preparadas con el mismo perfil de flavonoides de las primeras. Cabe destacar que estas se debieron preparar a una concentración de los flavonoides 10 veces superior a lo encontrado en las mieles reales, debido a que estudios preliminares mostraron que mieles sintéticas conteniendo las mismas concentraciones de flavonoides que las mieles reales no generaron H₂O₂. Este hecho indica que la generación de H₂O₂ por parte de los flavonoides en la matriz miel sería producto de una acción sinérgica (Jacobs y Tapsell, 2013) y/o que otros factores aportan de manera significativa en su generación. La Tabla 19 presenta exclusivamente las mieles simuladas que

demonstraron producción de peróxido de hidrógeno tanto en ausencia como en presencia de Fe(III) y sus respectivas mieles reales.

Tabla 19. Generación de H₂O₂ μM en mieles sintéticas y reales al 20% p/v.

Muestra	Miel simulada*		Miel real	
	H ₂ O ₂ μM			
	Sin Fe(III)	Fe(III) 50 μM	Sin Fe(III)	Fe(III) 50 μM
M29-IV	-	3,4 ± 0,2	138,2 ± 0,9	145 ± 2
M6-V	-	6,5 ± 0,1	50 ± 1	61 ± 1
M27-V	-	4,52 ± 0,01	56,3 ± 0,3	51,65 ± 0,06
M9-RM	-	4,9 ± 0,1	416 ± 21	267 ± 18
M28-RM	3,99 ± 0,04	5,8 ± 0,2	224 ± 9	107 ± 6
M23-X	-	3,94 ± 0,03	323 ± 9	261 ± 4
M25-X	-	4,08 ± 0,03	23,1 ± 0,3	35,0 ± 0,3

*cantidad de flavonoides 10 veces superior a la miel real.

Como se evidencia en los resultados, de las 15 mieles simuladas sometidas a análisis, únicamente 7 de ellas fueron capaces de generar peróxido de hidrógeno a una concentración de flavonoides incrementada 10 veces a la encontrada en la miel real y solo en presencia de Fe(III) (exceptuando la miel M28-RM). De esta forma se corrobora el efecto catalítico que posee este catión en la producción de H₂O₂. Cabe destacar que la miel M28-RM posee la mayor cantidad de flavonoides lo que explica la capacidad de su correspondiente miel sintética de producir H₂O₂.

Similar a lo observado en la miel sintética para los flavonoides de forma individual, se obtuvo razones molares que variaron de 0,15 a 0,45 entre H₂O₂ producido y la suma de flavonoides en presencia de Fe(III). Estos resultados demuestran que en mieles sintéticas los flavonoides poseen un efecto sumatorio en la producción de H₂O₂. La generación de H₂O₂ en mieles reales fue en promedio 300 veces mayor que en las mieles simuladas. Como ya se mencionó previamente, esto indicaría que en la miel real los flavonoides actuarían de

forma sinérgica más que sumatoria. Evidentemente hay otros factores presentes en la miel que pueden incidir en esta mayor producción de H_2O_2 con relación al modelo simplificado. Sin embargo, el rol de los flavonoides en presencia de Fe(III) es significativo.

7.5 Evaluar la generación de peróxido de hidrógeno en extractos de miel concentrados y agotados en flavonoles y flavonas en ausencia y presencia de Fe(III)

7.5.1 Generación de H_2O_2 en extractos concentrados y agotados

En el transcurso de la investigación se llevaron a cabo evaluaciones de la generación de H_2O_2 en dos extractos distintos de miel: el extracto concentrado en flavonoides (EC) y el extracto agotado en flavonoides (EA), ambos sometidos previamente a un tratamiento específico, detallado en la metodología. Estos ensayos se realizaron en soluciones de miel al 20% p/v. Los resultados se muestran en la Figura 27.

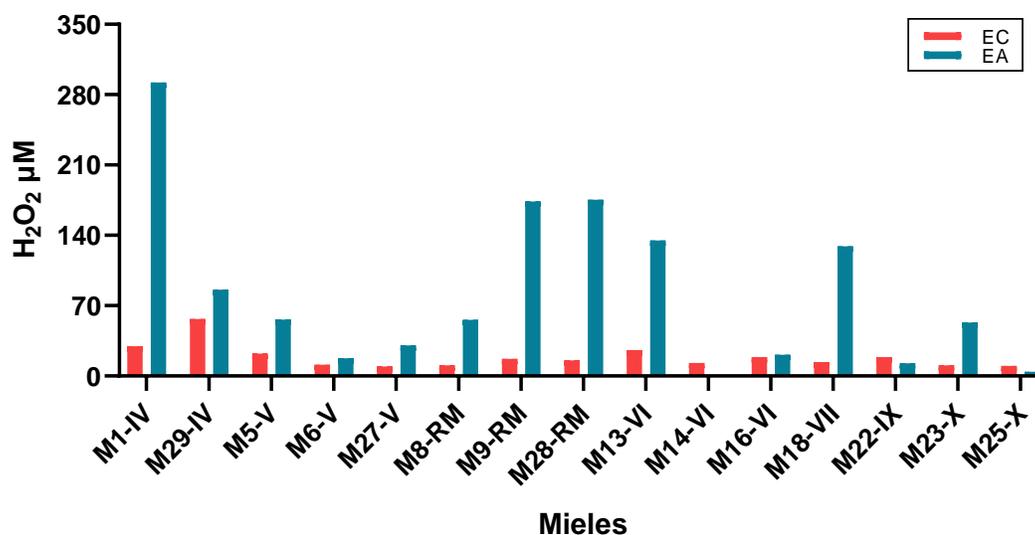


Figura 27. Comparación de la generación de H_2O_2 en extracto concentrado (EC) y agotado (EA) en flavonoides.

Los valores obtenidos fueron opuestos a las expectativas iniciales. Contrario a la suposición de que la mayor contribución a la generación de H_2O_2 provendría del EC, se observó que el EA generó en promedio, 5 veces más peróxido de hidrógeno que el EC; hallazgo que sugiere una participación relevante de la glucosa oxidasa aportada por las abejas a la producción de peróxido de hidrógeno de la miel y que estaría presente en el EA.

El análisis obtenido destaca la complejidad de las interacciones en la miel. Si bien los flavonoides desempeñan un papel significativo en la generación de H_2O_2 , la glucosa oxidasa emerge como un actor principal en la generación de la ROS.

7.5.2 Generación de H_2O_2 en extractos concentrados y agotados en presencia de Fe(III)

Considerando los resultados obtenidos en el punto anterior, se realizó una evaluación más detallada de los EC y EA en flavonoides tanto en ausencia como en presencia de Fe(III). Esto se llevó a cabo con el propósito de explorar en una matriz más simplificada las posibles interacciones entre los flavonoides presentes en los extractos y el Fe(III).

En la Figura 28 se presentan los resultados de la generación de H_2O_2 al añadir Fe(III) a los EC. Se observa que en 11 de ellas existen diferencias estadísticamente significativas, lo que indica que la presencia de Fe(III) impacta de manera positiva en la generación de H_2O_2 . Adicionalmente, las 4 mieles restantes muestran aumentos en la producción, aunque no alcanzan significancia estadística. El aumento promedio en la producción de H_2O_2 para las 15 muestras de miel corresponde al 30%, sugiriendo la posible influencia de la complejación Fe(III)-flavonoide en estas soluciones de miel, lo que favorece

la actividad prooxidante, tal como se discutió y mostró previamente en la Figura 17. Además, este efecto de incremento en la generación de H_2O_2 por Fe(III) en los EC fue similar a lo observado en las mieles sintéticas.

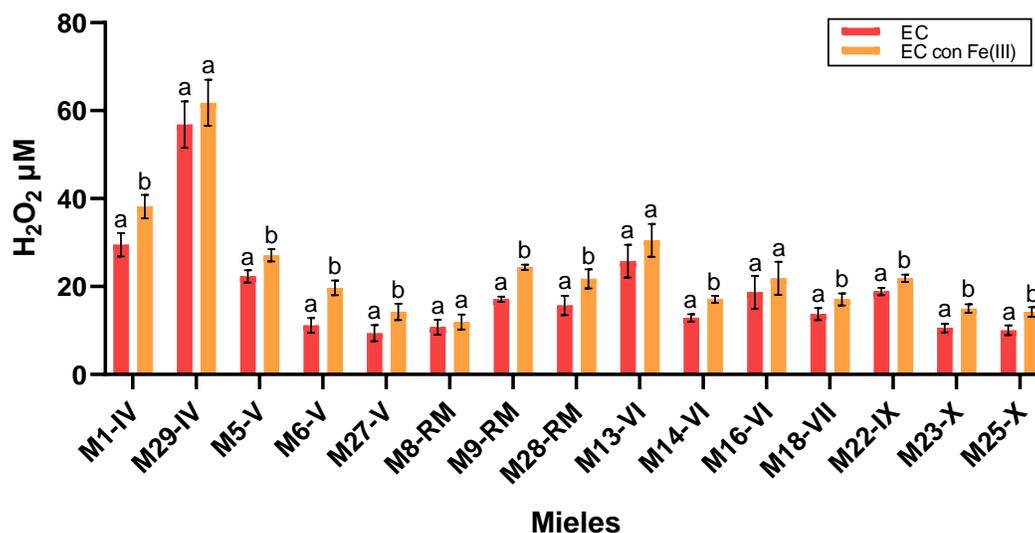


Figura 28. Comparación de la generación de H_2O_2 en EC y EC en presencia de Fe(III).

Por otra parte, en relación con los extractos agotados los resultados se detallan en la Figura 29. Se destaca que, de las 15 mieles analizadas, 6 muestran una reducción significativa en la producción de la ROS al añadir Fe(III). Estas mieles pertenecen a las categorías de alta e intermedia producción, sugiriendo que la presencia del catión afecta de manera más notoria a mieles con mayores niveles de H_2O_2 . De las mieles restantes, la mayoría presenta una disminución, aunque no significativa.

En promedio, para las 6 mieles con diferencias significativas, la disminución en la producción de H_2O_2 alcanza el 35%, mientras que, considerando todas las mieles (excepto M14-VI, que no produjo), la disminución global es del 16%. Esta disminución en la generación de H_2O_2 se podría explicar por la inhibición

de la actividad de la glucosa oxidasa presente en los extractos por parte de Fe(III). Wu y col. (2017), observaron que la glucosa oxidasa se ve afectada por la presencia de iones metálicos debido a que estos son capaces de coordinarse con la forma reducida del cofactor (FADH₂) en el sitio activo de la GOx, impidiendo que el FADH₂ reduzca el O₂ a H₂O₂ (Figura 3), resultando en una inhibición parcial de la GOx.

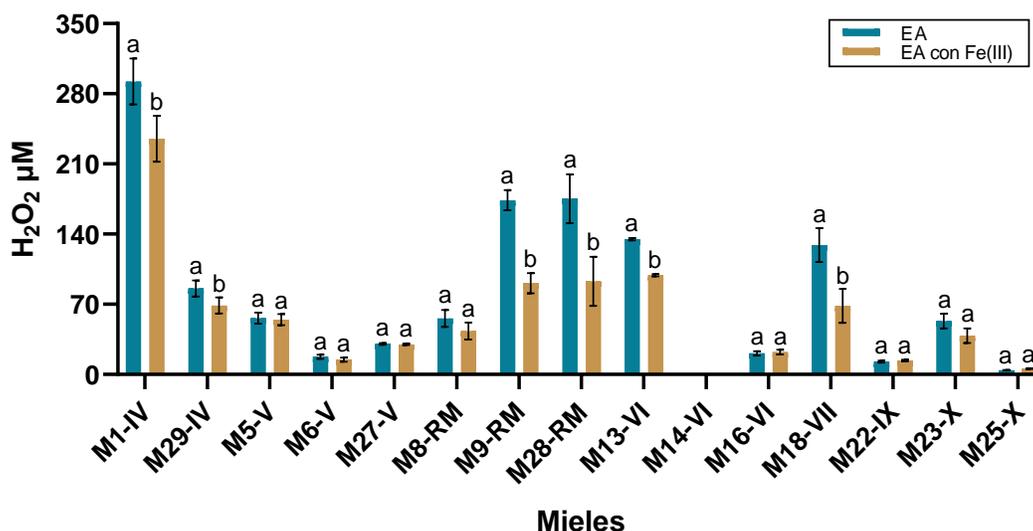


Figura 29. Comparación de la generación de H₂O₂ en EA y EA en presencia de Fe(III).

Estos resultados son similares a los obtenidos para las mieles consideradas de alta producción (Figura 19, sección 7.3.3); las que registraron una disminución en la producción de peróxido de hidrógeno en presencia de Fe(III). Estos resultados indican que el efecto de Fe(III) dependerá de la composición inicial de la miel, donde se debe considerar la contribución tanto de la glucosa oxidasa como de los flavonoides, ya que el catión posee efectos inversos al agregarlo tanto en el extracto concentrado como el agotado. Así, en mieles crudas con mayor producción de H₂O₂ (alrededor de 200 µM) su disminución al agregar

Fe(III) indicaría una actividad predominante de GOx en este sentido; la que se ve inhibida por formación de los complejos Fe(III)-GOx. La complejidad de estos patrones subraya la importancia de considerar la composición inicial de las mieles al evaluar la respuesta frente a distintos factores, como los cationes metálicos.

7.5.3 Comparación de producción de H₂O₂ en miel cruda, extractos y miel sintética

La comparación de la generación de H₂O₂ en miel cruda, sus extractos y la correspondiente miel sintética, busca proporcionar una visión integral de los factores que influyen en su capacidad prooxidante. Para ello, se deproteinizó el EA con el fin de observar si la eliminación de las proteínas disminuía la generación de la ROS (asociada a la acción de GOx). Los resultados se presentan en la Figura 30, para una miel con alta (M13-VI), intermedia (M27-V) y baja (M16-VI) producción de H₂O₂.

Para las 3 mieles estudiadas la suma de H₂O₂ producido por EC y EA se aproximó al valor de la miel cruda; siendo mucho mayor el valor en el EA que el EC para la miel de alta producción. Esta diferencia es menos acentuada en las mieles de producción intermedia y baja. Como se mencionó previamente, en mieles con mayor generación de H₂O₂ el aporte por actividad de GOx sería mayor que el de los flavonoides. La disminución significativa o producción nula de H₂O₂ en el extracto agotado deproteinizado confirma la actividad de GOx en estas mieles como esencial.

Por otra parte, similar a la miel cruda, se observó una elevada relación molar entre el peróxido de hidrógeno producido y los flavonoides en los EC (10:1 aproximadamente). Por el contrario, en la miel sintética, incluso con una

concentración diez veces mayor de flavonoides, no hubo producción de peróxido. Esto subraya la importancia de la matriz en la que se encuentran estos componentes para lograr un efecto sinérgico en la producción de ROS.

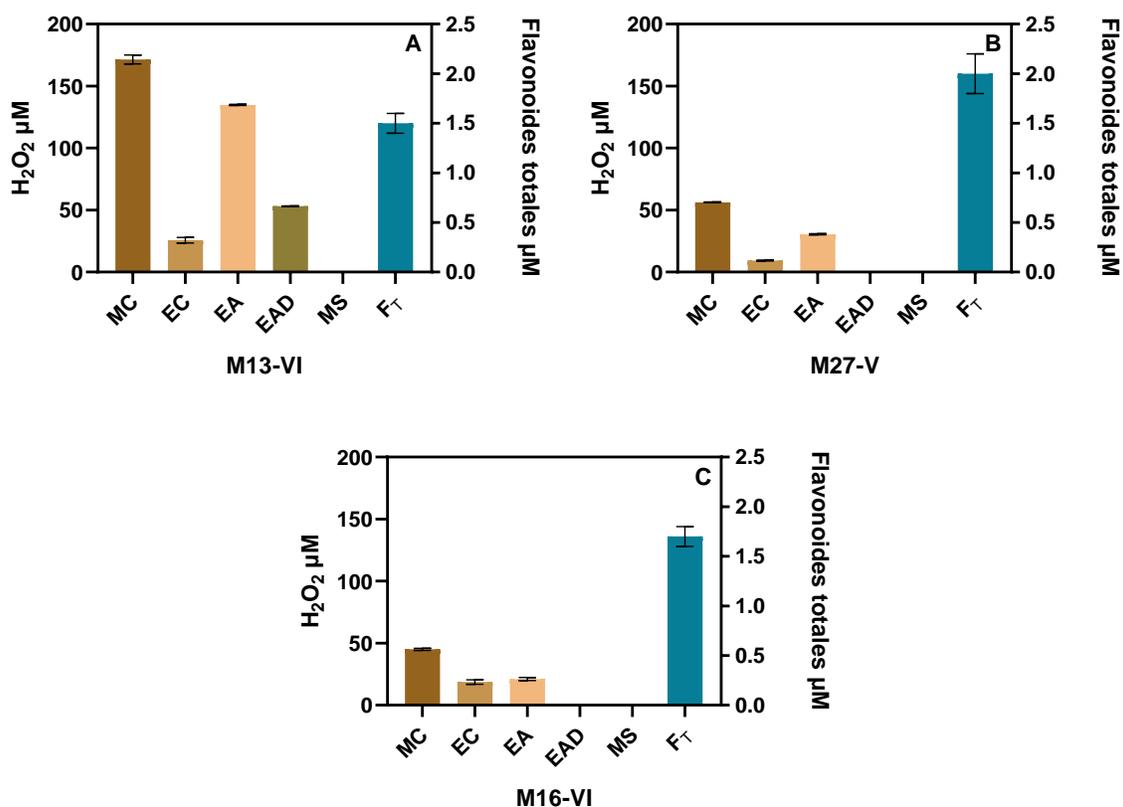


Figura 30. Producción de H₂O₂ en MC: miel cruda, EC: extracto concentrado, EA: extracto agotado, EAD: extracto agotado deproteinizado, MS: miel sintética (con una concentración total de flavonoides 10 veces la de las mieles reales correspondientes) y FT: flavonoides totales) para **A) M13-VI B) M27-V y C) M16-VI.**

De esta manera queda demostrado que la presencia de flavonoides en conjunto con la GOx en la miel posee un efecto sumatorio para la producción de peróxido de hidrógeno, mientras que los flavonoides poseen un efecto sinérgico en la matriz de la miel.

8 CONCLUSIONES

La generación de H_2O_2 en la miel depende de su contenido de flavonoides y de la enzima glucosa oxidasa, con un efecto sumatorio entre ambos componentes y una acción sinérgica de los primeros en la matriz miel. Estos efectos son modulados por $Fe(III)$, ya que este catión estimula la producción de H_2O_2 por parte de los flavonoides e inhibe la actividad de la enzima.

Se demostró que los flavonoides estudiados presentan autooxidación con la correspondiente producción de H_2O_2 en un modelo simplificado de miel, siendo esta reacción catalizada por la presencia de $Fe(III)$ y $Cu(II)$; particularmente en el caso de las flavonoles, debido a que cumplen con al menos dos criterios estructurales para que puedan actuar como complejantes eficientes de los cationes y como agentes prooxidantes. Este mecanismo de complejación y óxido-reducción operaría en las mieles reales.

Por otra parte, los resultados obtenidos no permiten ser concluyentes en cuanto al efecto de $Cu(II)$ sobre la generación de H_2O_2 en la miel. Sin embargo, dado el contenido de este elemento determinado en las mieles chilenas y considerando su efecto en la generación de H_2O_2 observado en mieles sintéticas, sería de interés realizar más estudios sobre el rol que tendría en la generación de ROS en mieles reales.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Daughenbaugh, K. F., Kahnonitch, I., Carey, C. C., McMenamin, A. J., Wiegand, T., Erez, T., Arkin, N., Ross, B., Wiedenheft, B., Sadeh, A., Chejanovsky, N., Mandelik, Y., & Flenniken, M. L. (2021). Metatranscriptome analysis of sympatric bee species identifies bee virus variants and a new virus, Andrena-associated bee virus-1. *Viruses*, *13*(2), 291. <https://doi.org/10.3390/v13020291>
2. Han, F., Wallberg, A., & Webster, M. T. (2012). From where did the Western honeybee (*Apis mellifera*) originate?. *Ecology and evolution*, *2*(8), 1949-1957. <https://doi.org/10.1002/ece3.312>
3. Trhlin, M., & Rajchard, J. (2011). Chemical communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.): a review. *Vet. Med*, *56*(6), 265-73. <https://doi.org/10.17221/1543-vetmed>
4. Crane, E. (2009). *Apis* Species:(Honey Bees). In *Encyclopedia of Insects* (pp. 31-32). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00009-6>
5. Nader, R. A., Mackieh, R., Wehbe, R., El Obeid, D., Sabatier, J. M., & Fajloun, Z. (2021). Beehive products as antibacterial agents: a review. *Antibiotics*, *10*(6), 717. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060717>
6. Bobiș, O., Mărghițaș, L. A., Dezmirean, D., Bonta, V., & Mihai, C. M. (2010). Beehive products: source of nutrients and natural biologically active compounds. *J. Agroalim. Proc. Technol*, *16*(2), 104-109.
7. Iturra, C. *Apicultura Chilena: principales cifras y desafíos futuros*. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias–ODEPA. MINISTERIO DE AGRICULTURA. 2021. 8 p.

8. White Jr, J. W. (1978). Honey. *Advances in food research*, 24, 287-374.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60160-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60160-3)
9. Bradbear, N. (2009). Definition and uses of honey in bees and their role in forest livelihoods. *FAO, Rome, Italy*,
<https://www.fao.org/3/i0842e/i0842e.pdf>
10. Kolayli, S., Boukraâ, L., Şahin, H., & Abdellah, F. (2012). Sugars in honey. *Dietary sugars: Chemistry, analysis, function and effects*, 3, 15.
11. Santos-Buelga, C., & González-Paramás, A. M. (2017). Chemical composition of honey. *Bee products-chemical and biological properties* (pp. 43-82).
12. Bogdanov, S., Haldimann, M., Luginbühl, W., & Gallmann, P. (2007). Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects. *Journal of Apicultural Research*, 46(4), 269-275.
<https://doi.org/10.1080/00218839.2007.11101407>
13. Solayman, M., Islam, M. A., Paul, S., Ali, Y., Khalil, M. I., Alam, N., & Gan, S. H. (2016). Physicochemical properties, minerals, trace elements, and heavy metals in honey of different origins: a comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 219-233. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12182>
14. Bonté, F., & Desmoulière, A. (2013). Le miel: origine et composition. *Actualités pharmaceutiques*, 52(531), 18-21.
<https://doi.org/10.1016/j.actpha.2013.10.004>
15. Sak-Bosnar, M., & Sakač, N. (2012). Direct potentiometric determination of diastase activity in honey. *Food chemistry*, 135(2), 827-831.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.006>
16. Cebrero, G., Sanhueza, O., Pezoa, M., Báez, M. E., Martínez, J., Báez, M., & Fuentes, E. (2020). Relationship among the minor constituents,

- antibacterial activity and geographical origin of honey: A multifactor perspective. *Food chemistry*, 315, 126296.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126296>
17. Wang, J., & Li, Q. X. (2011). Chemical composition, characterization, and differentiation of honey botanical and geographical origins. *Advances in food and nutrition research*, 62, 89-137. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385989-1.00003-X>
18. Kwakman, P. H., Velde, A. A. T., de Boer, L., Speijer, D., Christina Vandebroucke-Grauls, M. J., & Zaat, S. A. (2010). How honey kills bacteria. *The FASEB Journal*, 24(7), 2576-2582.
<https://doi.org/10.1096/fj.09-150789>
19. Moreira, R. F., De Maria, C. A., Pietrolungo, M., & Trugo, L. C. (2007). Chemical changes in the non-volatile fraction of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. *Food chemistry*, 104(3), 1236-1241.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.006>
20. Brudzynski, K. (2020). A current perspective on hydrogen peroxide production in honey. A review. *Food chemistry*, 332, 127229.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127229>
21. Mato, I., Huidobro, J. F., Simal-Lozano, J., & Sancho, M. T. (2003). Significance of nonaromatic organic acids in honey. *Journal of food protection*, 66(12), 2371-2376. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.12.2371>
22. Mato, I., Huidobro, J. F., Simal-Lozano, J., & Sancho, M. T. (2006). Rapid determination of nonaromatic organic acids in honey by capillary zone electrophoresis with direct ultraviolet detection. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(5), 1541-1550. <https://doi.org/10.1021/jf051757i>

23. da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food chemistry*, *196*, 309-323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>
24. Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T., Afrin, S., Gasparri, M., Reboledo-Rodríguez, P., Manna, P., Zhang, J., Bravo Lamas, L., Martínez Flórez, S., Agudo Toyos, P., Quiles, J., Giampieri, F., & Battino, M. (2018). Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. *Molecules*, *23*(9), 2322. <https://doi.org/10.3390/molecules23092322>
25. Alvarez-Suarez, J., Giampieri, F., & Battino, M. (2013). Honey as a source of dietary antioxidants: structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. *Current medicinal chemistry*, *20*(5), 621-638. <https://doi.org/10.2174/092986713804999358>
26. Mandal, M. D., & Mandal, S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, *1*(2), 154-160. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60016-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60016-6)
27. Brudzynski, K., Abubaker, K., St-Martin, L., & Castle, A. (2011). Re-examining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey. *Frontiers in microbiology*, *2*, 213. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00213>
28. Brudzynski, K., & Lannigan, R. (2012). Mechanism of honey bacteriostatic action against MRSA and VRE involves hydroxyl radicals generated from honey's hydrogen peroxide. *Frontiers in microbiology*, *3*, 36. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00036>
29. Bucekova, M., Buriova, M., Pekarik, L., Majtan, V., & Majtan, J. (2018). Phytochemicals-mediated production of hydrogen peroxide is crucial for

- high antibacterial activity of honeydew honey. *Scientific reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27449-3>
30. Bucekova, M., Jardekova, L., Juricova, V., Bugarova, V., Di Marco, G., Gismondi, A., Leonardi, D., Farkasovska, J., Godocikova, J., Laho, M., Klaudiny, J., Majtan, V., Canini, A., & Majtan, J. (2019). Antibacterial activity of different blossom honeys: New findings. *Molecules*, 24(8), 1573. <https://doi.org/10.3390/molecules24081573>
31. Strelec, I., Crevar, B., Kovac, T., Bilic Rajs, B., Primorac, L., & Flanjak, I. (2018). Glucose oxidase activity and hydrogen peroxide accumulation in Croatian honeys. *Croatian journal of food science and technology*, 10(1), 33-41. <https://doi.org/10.17508/cjfst.2018.10.1.06>
32. Brudzynski, K., Abubaker, K., & Miotto, D. (2012). Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: Polyphenol/H₂O₂-induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation. *Food chemistry*, 133(2), 329-336. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.035>
33. Chávez-González, M. L., Sepúlveda, L., Verma, D. K., Luna-García, H. A., Rodríguez-Durán, L. V., Iliina, A., & Aguilar, C. N. (2020). Conventional and emerging extraction processes of flavonoids. *Processes*, 8(4), 434. <https://doi.org/10.3390/pr8040434>
34. Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
35. Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, 30(18), 3268-3295. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700261>

36. Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>
37. Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C., & Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177(1), 67-80. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00196-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00196-8)
38. Amic, D., Davidovic-Amic, D., Beslo, D., Rastija, V., Lucic, B., & Trinajstic, N. (2007). SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Current medicinal chemistry*, 14(7), 827-845. <https://doi.org/10.2174/092986707780090954>
39. Yupanqui Mieles, J., Vyas, C., Aslan, E., Humphreys, G., Diver, C., & Bartolo, P. (2022). Honey: An Advanced Antimicrobial and Wound Healing Biomaterial for Tissue Engineering Applications. *Pharmaceutics*, 14(8), 1663. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081663>
40. Hajji, H. E., Nkhili, E., Tomao, V., & Dangles, O. (2006). Interactions of quercetin with iron and copper ions: complexation and autoxidation. *Free radical research*, 40(3), 303-320. <https://doi.org/10.1080/10715760500484351>
41. Selvaraj, S., Krishnaswamy, S., Devashya, V., Sethuraman, S., & Krishnan, U. M. (2014). Flavonoid–metal ion complexes: a novel class of therapeutic agents. *Medicinal research reviews*, 34(4), 677-702. Portico. <https://doi.org/10.1002/med.21301>
42. Miura, Y. H., Tomita, I., Watanabe, T., Hirayama, T., & Fukui, S. (1998). Active oxygens generation by flavonoids. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21(2), 93-96. <https://doi.org/10.1248/bpb.21.93>
43. El Amrani, F. B. A., Perelló, L., Real, J. A., González-Alvarez, M., Alzuet, G., Borrás, J., García-Granda, S., & Montejo-Bernardo, J. (2006). Oxidative

- DNA cleavage induced by an iron (III) flavonoid complex: Synthesis, crystal structure and characterization of chlorobis (flavonolato)(methanol) iron (III) complex. *Journal of inorganic biochemistry*, 100(7), 1208-1218.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.01.036>
44. Dong, H., Yang, X., He, J., Cai, S., Xiao, K., & Zhu, L. (2017). Enhanced antioxidant activity, antibacterial activity and hypoglycemic effect of luteolin by complexation with manganese (II) and its inhibition kinetics on xanthine oxidase. *Rsc Advances*, 7(84), 53385-53395.
<https://doi.org/10.1039/C7RA11036G>
45. Bokare, A. D., & Choi, W. (2014). Review of iron-free Fenton-like systems for activating H₂O₂ in advanced oxidation processes. *Journal of hazardous materials*, 275, 121-135. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.04.054>
46. Yung An, C., Hossain, M. M., Alam, F., Islam, M. A., Khalil, M. I., Alam, N., & Gan, S. H. (2016). Efficiency of polyphenol extraction from artificial honey using C 18 cartridges and Amberlite® XAD-2 resin: A comparative study. *Journal of Chemistry*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8356739>
47. Taube, P. S., Sousa Dourado, G., Valentim Gomes, V., Vieira Maia, M. T., Abinader Vasconcelos, A., Santana da Costa, K., do Carmo Faial, K., Santana Carneiro, B., & Trindade Vasconcelos Junior, N. (2019). Determination of Macro and Trace Element Levels in Honey from the Lower Amazonian Region, Brazil. *Brazilian Journal of Analytical Chemistry*, 6(23). <https://doi.org/10.30744/brjac.2179-3425.ar.140-2018>
48. Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, BA, Thiessen, PA, Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J. y Bolton, EE (2023). Actualización de PubChem 2023. *Nucleic Acids Research*, 51 (D1), D1373–D1380. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac956>

49. Eghbaliferiz, S., & Iranshahi, M. (2016). Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: updated review of mechanisms and catalyzing metals. *Phytotherapy Research*, *30*(9), 1379-1391. Portico. <https://doi.org/10.1002/ptr.5643>
50. Velásquez, P., Montenegro, G., Leyton, F., Ascar, L., Ramirez, O., & Giordano, A. (2020). Bioactive compounds and antibacterial properties of monofloral Ulmo honey. *CyTA-Journal of Food*, *18*(1), 11-19. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1701559>
51. Zhu, Z., Zhang, Y., Wang, J., Li, X., Wang, W., & Huang, Z. (2019). Sugaring-out assisted liquid-liquid extraction coupled with high performance liquid chromatography-electrochemical detection for the determination of 17 phenolic compounds in honey. *Journal of Chromatography A*, *1601*, 104-114. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.06.023>
52. Martos, I., Ferreres, F., Yao, L., D'Arcy, B., Caffin, N., & Tomás-Barberán, F. A. (2000). Flavonoids in monospecific Eucalyptus honeys from Australia. *Journal of agricultural and food chemistry*, *48*(10), 4744-4748. <https://doi.org/10.1021/jf000277i>
53. Nakabayashi, R., Mori, T., & Saito, K. (2014). Alternation of flavonoid accumulation under drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant signaling & behavior*, *9*(8), e29518. <https://doi.org/10.4161/psb.29518>
54. Schein, O. D., Vicencio, C., Muñoz, B., Gelatt, K. N., Duncan, D. D., Nethercott, J., Koren, H. S., & West, S. (1995). Ocular and dermatologic health effects of ultraviolet radiation exposure from the ozone hole in southern Chile. *American journal of public health*, *85*(4), 546-550. <https://doi.org/10.2105/ajph.85.4.546>

- 55.Ferreyra, M. L. F., Serra, P., & Casati, P. (2021). Recent advances on the roles of flavonoids as plant protective molecules after UV and high light exposure. *Physiologia Plantarum*, *173*(3), 736-749. Portico. <https://doi.org/10.1111/pp1.13543>
- 56.Sakač, M. B., Jovanov, P. T., Marić, A. Z., Pezo, L. L., Kevrešan, Ž. S., Novaković, A. R., & Nedeljković, N. M. (2019). Physicochemical properties and mineral content of honey samples from Vojvodina (Republic of Serbia). *Food chemistry*, *276*, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.149>
- 57.Lobos, I., Silva, M., Ulloa, P., & Pavez, P. (2022). Mineral and botanical composition of honey produced in Chile's Central-Southern region. *Foods*, *11*(3), 251. <https://doi.org/10.3390/foods11030251>
- 58.Servicio nacional de Geología y Minería (Chile). (2022). *ANUARIO DE LA MINERÍA DE CHILE 2022*.
- 59.Liberato, M. da C. T. C., Morais, S. M. de, Magalhães, C. E. de C., Magalhães, I. L., Cavalcanti, D. B., & Silva, M. M. de O. (2013). Physicochemical properties and mineral and protein content of honey samples from Ceará State, Northeastern Brazil. *Food Science and Technology*, *33*, 38-46. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612013005000028>
- 60.Tuzen, M., Silici, S., Mendil, D., & Soylak, M. (2007). Trace element levels in honeys from different regions of Turkey. *Food chemistry*, *103*(2), 325-330. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.053>
- 61.Brudzynski, K. (2006). Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Canadian journal of microbiology*, *52*(12), 1228-1237. <https://doi.org/10.1139/w06-086>
- 62.Henriques, A. F., Jenkins, R. E., Burton, N. F., & Cooper, R. A. (2011). The effect of manuka honey on the structure of *Pseudomonas*

- aeruginosa. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 30(2), 167-171. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-1065-1>
63. Ahmadi–Motamayel, F., Hendi, S. S., Alikhani, M. Y., & Khamverdi, Z. (2013). Antibacterial activity of honey on cariogenic bacteria. *Journal of Dentistry (Tehran, Iran)*, 10(1), 10.
64. Brudzynski, K. (2023). Unexpected Value of Honey Color for Prediction of a Non-Enzymatic H₂O₂ Production and Honey Antibacterial Activity: A Perspective. *Metabolites*, 13(4), 526. <https://doi.org/10.3390/metabo13040526>
65. Faúndez, X., Báez, M. E., Martínez, J., Zúñiga-López, M. C., Espinoza, J., & Fuentes, E. (2023). Evaluation of the generation of reactive oxygen species and antibacterial activity of honey as a function of its phenolic and mineral composition. *Food Chemistry*, 426, 136561. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136561>
66. Bukhari, S. B., Memon, S., Mahroof-Tahir, M., & Bhangar, M. I. (2009). Synthesis, characterization and antioxidant activity copper–quercetin complex. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71(5), 1901-1906. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2008.07.030>
67. Pyrzynska, K., & Biesaga, M. (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *TrAC trends in analytical chemistry*, 28(7), 893-902. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.03.015>
68. Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-523. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>
69. Dimitrić Marković, J. M., Amić, D., Lučić, B., & Marković, Z. S. (2014). Oxidation of kaempferol and its iron (III) complex by DPPH radicals:

- spectroscopic and theoretical study. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 145(4), 557-563. <https://doi.org/10.1007/s00706-013-1135-z>
70. Marković, J. M. D., Marković, Z. S., Brdarić, T. P., Pavelkić, V. M., & Jadranin, M. B. (2011). Iron complexes of dietary flavonoids: Combined spectroscopic and mechanistic study of their free radical scavenging activity. *Food chemistry*, 129(4), 1567-1577. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.008>
71. Sungur, Ş., & Uzar, A. (2008). Investigation of complexes tannic acid and myricetin with Fe (III). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 69(1), 225-229. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2007.03.038>
72. Jacobs, D. R., & Tapsell, L. C. (2013). Food synergy: the key to a healthy diet. *Proceedings of the Nutrition Society*, 72(2), 200-206. <https://doi.org/10.1017/s0029665112003011>
73. Wu, Y., Chu, L., Liu, W., Jiang, L., Chen, X., Wang, Y., & Zhao, Y. (2017). The screening of metal ion inhibitors for glucose oxidase based on the peroxidase-like activity of nano-Fe₃O₄. *RSC Advances*, 7(75), 47309-47315. <https://doi.org/10.1039/c7ra07081k>