

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***EVALUACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA
MIEL ASOCIADOS A LA GENERACION DE ESPECIES
REACTIVAS DE OXÍGENO Y LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Química área de Especialización en Química Analítica.**

XIMENA DEL PILAR FAÚNDEZ TAPIA

**Director de Tesis: Dr. Edwar Fuentes Pérez
Dra. M. Carolina Zúñiga López**

Santiago-CHILE

Marzo 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

XIMENA DEL PILAR FAÚNDEZ TAPIA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química, Área de Especialización: Química Analítica, en el examen público rendido el día

Directores de Tesis:

Dr. Edwar Fuentes Pérez

Dra. M. Carolina Zúñiga López

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. M. Loreto Áscar Estay

Dra. Ady Giordano Villatoro

Dr. Claudio Olea Azar

“La duda es uno de los nombres de la inteligencia.”

Jorge Luis Borges

AGRADECIMIENTOS

Luego de este largo proceso que ya culmina, quiero agradecer en primer lugar a mi director de tesis, Dr. Edwar Fuentes, por acogerme en su equipo de trabajo, por su constante preocupación y apoyo para ejecutar este trabajo; a la Profesora Dra. María Carolina Zúñiga, directora, por su gran disposición de enseñar, explicar y guiarme en todo momento. Ambos siempre tuvieron la mejor de las voluntades para aclarar mis dudas y presionar cuando me sentía perdida y desanimada.

Muchas gracias por la colaboración en la ejecución de los estudios microbiológicos a la profesora Dra. Jessica Martínez y a su asistente de investigación Fabián Zúñiga del Centro de medicina regenerativa de la Universidad del Desarrollo. Al Laboratorio de Radicales libres y antioxidantes, de la Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas de la Universidad de Chile, a sus integrantes Mauricio, Josué y Gabriela, que en toda oportunidad que fui a hacer consultas, buscar reactivos o hacer mediciones, jamás tuvieron peros en salir a socorrerme. Al CEPEDEQ, en especial a Betsabé Sepúlveda, ¡que no se demoró nada con los análisis que llevaba meses tratando de obtener datos!, y su disposición para responder a todas mis inquietudes. Al Laboratorio de Química analítica de contaminantes orgánicos y elementos traza, que fue donde efectué la mayor parte experimental de este estudio, a las Profesoras Maru Báez y Jeannette Espinoza, gracias por esas conversaciones interminables que siempre culminaban en consejos y enseñanzas para la vida. a Karin, Sebastián, Marlén e Iván, que entre todos nos acompañamos y alentamos en los días de incertidumbre y desesperanza.

También no puedo olvidar a los amigos que me ha regalado la vida y que me han acompañado en todo momento: Hugo, Yanara, Carla Patricia, Francisca, Rosario, Paolo, Javiera, Esperanza, Javier, Manuel, Felipe, Anita, Jaime, Elizabeth y Cecilia; por acompañar, escuchar y alentarme cada vez que sentía que no daría el ancho. A los amigos internacionales: Kevin y Leo, quienes con desfase de horarios incluidos estaban atentos a cómo iba todo y cuando terminaría para al fin concretar el tan anhelado viaje de visita a sus respectivos países...claramente ellos vinieron a verme primero. A los amigos que encontré en esta aventura llamada magister, Carla y Sebastián,

por sus cafés y sus “lloraditas”, todo fue más llevadero cuando compartimos las preocupaciones, y también las alegrías. Gracias por esos momentos.

Doy las gracias y me siento bendecida por el constante apoyo brindado por mi familia. Mis abuelos: Guacolda y Carlos, que, con su cariño, cuidados, preocupación y también la perseverancia que he heredado de ellos; me enseñaron que solo el trabajo y esfuerzo me llevarían a alcanzar los sueños y metas. A mis tíos: Loreto, Carlos y Susana. Mis primos: María José, Susi, Carli e Ignacio, que, en esos cada vez más esporádicos viajes a Talca; me recargaban de energía para continuar. Su apoyo ha sido fundamental.

A mi Mamá y Macarena, quienes son el pilar fundamental en mi vida y que hicieron de este desafío como suyo y lo transformaron en un proyecto familiar. desde siempre me han incentivado a seguir aprendiendo, a arriesgarme y a no darme por vencida, por siempre creer en mí, y jamás dejarme vencer; sin ellas esto hubiese sido el triple más complejo. Mamá, tenías razón; así se llega a la NASA, solo con persistencia.

Al Laboratorio de Residuos de Plaguicidas y medio ambiente del INIA, por hacerme parte del equipo y siempre facilitarme los tiempos para dar término a este proceso.

Y, por último, reitero mis agradecimientos a todos aquellos que, injustamente, pueda haber olvidado mencionar pero que fueron un apoyo incondicional en esta aventura.

Agradezco el financiamiento otorgado por ANID a través del proyecto Fondecyt- Regular 119021 para llevar a cabo esta investigación.

FINANCIAMIENTO

Se agradece el financiamiento otorgado por el proyecto FONDECYT regular 1190217

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	8
INDICE DE TABLAS	10
INDICE DE FIGURAS.....	11
ABREVIATURAS.....	13
RESUMEN	14
SUMMARY	15
1.-INTRODUCCIÓN	16
1. 1. Composición de la miel.....	16
1.2.-La miel como alternativa de terapia antibacteriana.	18
1.3.- Rol de los polifenoles y microelementos en la propiedad antibacteriana de la miel. ...	19
2. HIPÓTESIS.....	26
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivos generales	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1 Materiales	27
4.1.1 Estándares.....	27
4.1.2. Solventes.....	27
4.1.3 Reactivos	28
4.1.4 Materiales	28
4.1.6 Software	29
4.1.7 Muestras.....	30
5. MÉTODOS	32
5.1 Determinación de pH	32
5.2 Determinación de contenido de polifenoles y flavonoides totales y específicos.	32
5. 2.1 Extracción de compuestos fenólicos desde la miel	32
5. 2.2 Determinación de Polifenoles y Flavonoides Totales	33
5.3.2 Determinación de H ₂ O ₂ , inhibiendo acción de GOX.	36
5.3.3 Determinación del radical hidroxilo.	36
5.4.- Contenido de cobre y hierro.....	37
5.5 Actividad antimicrobiana en miel	37
5.6 análisis de componentes principales y Regresión sobre mínimos cuadrados.	38

6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1.- Evaluar el contenido de polifenoles y flavonoides totales y específicos (ácido gálico, ácido caféico, ácido cumárico, ácido siríngico, ácido ferúlico, rutina, apigenina, crisina, kaempferol, quercetina, miricetina y ácido clorogénico) y del pH en muestras de miel de la zona central de Chile.	39
6.1.1 pH de las muestras de miel.....	39
6.1.2 Contenido de polifenoles y flavonoides totales.....	40
6.2 Determinar la concentración de H ₂ O ₂ y del radical hidroxilo en función de la función del tiempo de incubación en muestras de miel de la zona central de Chile.	54
6.2.1 Determinación de la concentración de H ₂ O ₂	54
6.2.2 Determinación de la concentración de radical OH •	61
6.3 Determinar el contenido de cobre, hierro, manganeso y cinc en muestras de miel de la zona central de Chile.....	64
6.4 Evaluar la actividad antibacteriana de muestras de miel de la zona central de Chile contra <i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i>	67
6.5 Establecer la existencia de correlaciones entre los compuestos químicos de la miel y su actividad antibacteriana mediante análisis multivariado.	69
7.-CONCLUSIONES.....	86
8.-REFERENCIAS.	87

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Resumen de mieles estudiadas, según su origen geográfico, botánico y año de recolección.</i>	31
<i>Tabla 2. Registro pH de mieles estudiadas.</i>	39
<i>Tabla 3. Ensayo de recuperación método SULLE.</i>	40
<i>Tabla 4. Principales cifras de méritos analíticas correspondiente a la cuantificación de ácidos fenólicos y flavonoides de interés en la miel mediante HPLC-DAD.</i>	44
<i>Tabla 5. Contenido de polifenoles totales (μg GAE/g de miel) y ácidos fenólicos identificados ($\mu\text{g/g}$ de miel) en las mieles analizadas.</i>	49
<i>Tabla 6. Contenido de flavonoides totales ($\mu\text{gQue/g}$ de miel) y específicos identificados ($\mu\text{g/g}$ de miel) en las mieles estudiadas.</i>	52
<i>Tabla 7. Contenido de polifenoles (ácidos fenólicos y flavonoides) en mieles del mundo.</i>	53
<i>Tabla 8. Formación de peróxido de hidrógeno en miel diluida en agua ultrapura y en buffer fosfato pH 6.5 (expresado en μg por gramo de miel).</i>	55
<i>Tabla 9. Concentración de H_2O_2 en mieles provenientes de distintos lugares del mundo.</i>	59
<i>Tabla 10. Contenido de hierro, cobre, zinc y manganeso (mg/kg de miel) en las mieles estudiadas.</i>	65
<i>Tabla 11. Tabla de correlaciones individuales (r) y significancia ($p \leq 0,05$) con la acumulación de peróxido de hidrógeno.</i>	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de reacción de polifenoles actuando como agentes prooxidantes en presencia de Cu^{2+} y O_2 . (Sakihama, 2002).	22
Figura 2. Estructura de los flavonoles miricetina (A) y quercetina (B), además de los ácidos fenólicos: ácido gálico (C) y ácido caféico (D). Imágenes catálogo Sigma-Aldrich (2020).	23
Figura 3. Mecanismo propuesto para la autooxidación de quercetina por $\text{Cu}(\text{II})$ y/o $\text{Cu}(\text{I})$ QH2: quercetina; QHCu I/II: complejo entre quercetina y $\text{Cu}(\text{II})$ o $\text{Cu}(\text{I})$; QSCu I: complejo entre quercetina oxidada y $\text{Cu}(\text{I})$. (Hajji et al., 2006).	24
Figura 4. Flavona y flavonoles, y sus patrones de sustitución. (Stalikas, 2007).	25
Figura 5. Mapa de Chile y localización de los sectores donde se obtuvieron las muestras de miel.	30
Figura 6. Metodología SULLE, desarrollada por Zhu et al., (2019)	33
Figura 7. Contenido de polifenoles totales de las mieles estudiadas.	41
Figura 8. Sitios de unión para metales de transición que presenta la estructura de los flavonoides; lo que permite formar complejos con estos; los que absorben a longitudes de onda visible y además favorecen su autooxidación y actividad prooxidante.	42
Figura 9. Contenido de flavonoides totales de las mieles analizadas.	43
Figura 10. Cromatogramas HPLC-DAD de estándares a 270 nm (A) y 360 nm (B). (ácido gálico (GA), Ácido cafeico (CA), Ácido cumárico (pCA), Ácido siríngico (SA), Ácido ferúlico (FA), Quercetina (Que), Miricetina (Mir), Rutina (Rut), Apigenina (Api), Crisina (Cri), Kaempferol (Kae) y ácido clorogénico (CGA))	45
Figura 11. Cromatogramas HPLC-DAD de las mieles M4-V(A) y M16-VI (B), registrados a 270nm. (Para identificación de los PFs ver figura 10)	46
Figura 12. Espectros de absorción de los patrones de los ácidos fenólicos identificados en las mieles estudiadas.	47
Figura 13. Espectro de absorción de los patrones de los Flavonoides identificados en las mieles analizadas	48
Figura 14. Cromatograma HPLC-DAD de la miel M9-RM registrado a 360 nm. Se observa la presencia de cinco flavonoides del interés de este estudio.	51
Figura 15. Acumulación de peróxido de hidrógeno ($\mu\text{g/g}$ de miel) al tiempo inicial, 3 y 24 horas en las mieles analizadas.	56
Figura 16. Gráficos comparativos que indican en a) aumento de H_2O_2 en el tiempo, b) mantiene y c) disminuye de la acumulación contenido de H_2O_2 en el tiempo.	57
Figura 17. Comparación de la acumulación de H_2O_2 ($\mu\text{g/g}$ de miel) a las 3 horas, con y sin inhibición de la GOX en las mieles analizadas	60
Figura 18. Espectros REE de (A) Aducto formado por el DMPO-OH, (B) la miel M20-VII y (C) señal control negativo, en donde hay ausencia del espín-aducto DMPO-OH	62
Figura 19. Formación de radical hidroxilo en las mieles expresado en cantidad relativa respecto a la miel con mayor generación (M17-VII).	63
Figura 20. Conetido de hierro (A), cobre (B), cinc (C) y manganeso (D) (mg/kg de miel) en las mieles analizadas.	66
Figura 21. Actividad antibacteriana de las mieles estudiadas contra <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> evaluada como concentración inhibitoria mínima (MIC)	68

Figura 22.(a, b) Diagramas esquemáticos de paredes celulares grampositivas y gramnegativas. (Madigan et al., 2009).	68
Figura 23.Gráficos de variables (loading), donde se observa A) PC1 v/s PC2 y B) PC1 v/s PC3. Se percibe en el óvalo verde, la relación en primera instancia entre la acumulación de H ₂ O ₂ (en medio acuoso a las 3h), radical hidroxilo, la suma de los flavonoides identificados por HPLC, crisina, apigenina, polifenoles totales, ácido gálico, quercetina y Fe.	71
Figura 24. Correlación entre la producción de H ₂ O ₂ y la suma de flavonoides identificados por cromatografía líquida (p= 0,0004).....	73
Figura 25.Actividad prooxidante de los flavonoides. Posterior la generación del radical superóxido una serie de reacciones llevan a la generación de peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.....	73
Figura 26. Gráfico de X/ Y loading, Donde la variable dependiente (Y), es la acumulación de H ₂ O ₂ a las 3 horas en medio acuoso, en función de una matriz de variables independientes (X)75	75
Figura 27.Coefficientes de regresión modelo PLS. Barras con valor positivo corresponde a variables con efecto prooxidante relacionados directamente con la generación de H ₂ O ₂ (pH, ácido p-cumarico, kaempferol, crisina, suma flavonoides identificados, Mn y Fe). Barras con valores negativos, son variables con efecto antioxidante (quercetina).....	76
Figura 28.Gráfico de X/ Y loading, Donde la variable dependiente (Y), es la generación de radical hidroxilo, en función de una matriz de variables independientes (X).....	78
Figura 29.Coefficientes de regresión del modelo PLS. Barras con valor positivo corresponde a variables con efecto prooxidante relacionados directamente con la generación del radical hidroxilo (ácido p-cumarico, apigenina, kaempferol, crisina, suma flavonoides identificados, Mn y Fe). Barras con valores negativos, son variables con efecto antioxidante (flavonoides totales, quercetina, Cu y Zn).....	79
Figura 30.Gráfico de X/ Y loading, Donde la variable dependiente (Y), corresponde a la MIC para <i>S. epidermidis</i> , en función de una matriz de variables independientes (X).....	81
Figura 31.Coefficientes de regresión del modelo PLS. Las barras negativas son los factores que están directamente relacionados con la acción antibacteriana (MIC) sobre <i>S. epidermidis</i> (polifenoles y flavonoides totales, ácido gálico, kaempferol, acumulación de H ₂ O ₂ y el contenido de hierro).....	81
Figura 32.Ruta propuesta para la generación del complejo Fe (II)-flavonoide a partir del complejo Fe (III)-flavonoide; el que produciría una escisión oxidativa del ADN bacteriano.....	82
Figura 33. Gráfico de X/ Y loading, Donde la variable dependiente (Y), corresponde a la concentración mínima inhibitoria para impedir el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> , en función de una matriz de variables independientes (X).....	84
Figura 34. Coeficientes de regresión del modelo PLS. Las barras negativas son los factores que están directamente relacionados con la acción antibacteriana (MIC) sobre <i>P. aeruginosa</i> (pH, polifenoles y flavonoides totales).....	84

ABREVIATURAS

PF	Polifenoles
GOX	Glucosa oxidasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
ABB	Actividad antibacterial
OH•	Radical hidroxilo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
ACN	Acetonitrilo
SULLE	sugaring-out assisted liquid-liquid extraction
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
CFT	Contenido de flavonoides totales
CPT	Contenido de polifenoles totales
DMPO	5,5-dimetilpirrona-N-óxido
REE	Resonancia del espín electrónico
HNO ₃	Ácido nítrico
OD	Densidad óptica
UFC	Unidades formadoras de colonias
LB	Caldo de cultivo Luria- Bertani
PCA	Análisis de componentes principales
PLS	Regresión sobre mínimos cuadrados
GA	Ácido gálico
CA	Acido cafeico
p-CA	Acido p-Coumarico
SA	Ácido siríngico
FA	Acido ferúlico
Que	Quercetina
Mir	Miricetina
Rut	Rutina
Api	Apigenina
Cri	Crisina
Kae	Kaempferol
CGA	Acido clorogénico
LOQ	Límite de cuantificación
MGO	Metilglioxal
MIC	Concentración mínima inhibitoria
FLID	Proteína flagelar con capacidad de adhesión
FLIC	flagelina de Pseudomonas aeruginosa
uM	Micromolar
% p/V	Porcentaje peso/volumen

RESUMEN

La miel es considerada como uno de los alimentos más comunes en la dieta humana que presenta efectos nutricionales positivos como también variadas propiedades beneficiosas, incluida su actividad antibacteriana (AAB). Varios factores están asociados con la AAB, como el pH ácido (3,5-5,0), la presión osmótica, los polifenoles (PF), el péptido defensina-1 y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como H_2O_2 y el radical hidroxilo. Se reportado que los PF de la miel tendrían un papel importante en la generación de ROS y AAB debido a su acción "prooxidante" modulada por algunos metales de transición. Sin embargo, las relaciones entre los diferentes componentes de la miel y su AAB siguen siendo materia de estudio. Así, los PFs y los metales en la miel determinarían la generación de H_2O_2 , radical OH y AAB de forma multifactorial. En este trabajo se determinaron los contenidos de PFs, Fe, Cu, Zn, Mn, H_2O_2 , radical OH y AAB frente a *S. epidermidis* y *P. aeruginosa* en 26 mieles colectadas de Chile central entre la IV y X regiones. Luego, se evaluó la relación entre ellos mediante análisis de componentes principales (PCA) y regresión sobre mínimos cuadrados parciales (PLS).

La frecuencia de aparición de los ácidos fenólicos en la miel fue gálico > p-cumárico > cafeico > ferúlico > sirínico > clorogénico (promedio 0,4-4,1 $\mu\text{g/g}$); mientras que para los flavonoides fue quercetina > crisina > kaempferol > apigenina > miricetina > rutina (promedio 0,3-1,5 $\mu\text{g/g}$). La concentración de metales fue Fe > Cu > Zn > Mn (promedio 2,5-6,1 $\mu\text{g/g}$). Todas las mieles mostraron acumulación de H_2O_2 (1,0-35 $\mu\text{g/g}$) y formación de radicales OH. Las mieles tuvieron un valor de MIC más bajo contra *S. epidermidis* que contra *P. aeruginosa* (promedio 14 y 18% p/v, respectivamente). El análisis multifactorial mostró que, a excepción de la quercetina, los PFs tienen un efecto "prooxidante" estimulando la generación de ROS; particularmente ácido p-cumárico, crisina, apigenina y kaempferol. Asimismo, Fe y Mn se relacionaron directamente con ROS, mientras que Cu se relacionó inversamente; posiblemente por estimulación de la autooxidación de flavonoides y reacción de Fenton (Fe y Mn) o formación de complejos con PFs con acción antioxidante (Cu). Se observó una relación directa entre AAB en *S. epidermidis* y PFs totales, kaempferol, H_2O_2 y Fe. Mientras que AAB en *P. aeruginosa* se relacionó principalmente con PFs totales. Así, la actividad antibacteriana estaría en gran medida ligada al origen botánico de la planta, ya que el perfil y cantidad de compuestos fenólicos influyen en la generación de ROS; los que a su vez participan en la inhibición del crecimiento bacteriano a través del daño oxidativo. Esta acción está modulada por otros factores, como el hierro, el manganeso y el cobre.

SUMMARY

Honey is a common food in the human diet exhibiting positive nutritional effects and various beneficial properties including its antibacterial activity (AAB). Several factors are associated with AAB, such as acidic pH (3.5-5.0), osmotic pressure, polyphenols (PFs), the peptide defensin-1 and the generation of reactive oxygen species (ROS), such as H₂O₂ and the hydroxyl radical. PFs of honey would have a major role in the generation of ROS and AAB due to its "prooxidant" action modulated by some transition metals. However, the relationships between the different components of honey and its AAB are still a subject of study. So, PFs and metals in honey would determine the generation of H₂O₂, OH radical and AAB in a multifactorial way. In this work, the contents of PFs, Fe, Cu, Zn, Mn, H₂O₂, OH radical and AAB against *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* were determined in 26 honeys collected from central Chile between the IV and X regions. Then, the relationships between them were evaluated through principal component analysis (PCA) and partial least square regression (PLS).

The frequency of appearance of phenolic acids in honey was gallic > p-coumaric > caffeic > ferulic > syringic > chlorogenic (average 0.4-4.1 µg/g); while for flavonoids was quercetin > chrysin > kaempferol > apigenin > myricetin > rutin (average 0.3- 1.5 µg/g). The metal concentration was Fe > Cu > Zn > Mn (average 2.5-6.1 µg/g). All honeys showed accumulation of H₂O₂ (1.0-35 µg/g) and OH radical formation. The honeys had lower MIC value against *S. epidermidis* than *P. aeruginosa* (average 14 and 18% p/v, respectively). The multifactorial analysis showed that, excepting quercetin, PFs have a "pro-oxidant" effect stimulating the generation of ROS; particularly p-coumaric acid, chrysin, apigenin and kaempferol. Likewise, Fe and Mn were directly related to ROS, while Cu was inversely related; possibly by the stimulation of flavonoid autoxidation and Fenton reaction (Fe and Mn) or formation of complex with PFs with antioxidant action (Cu). A direct relationship was observed between AAB on *S. epidermidis* and total PFs, kaempferol, H₂O₂ and Fe. While AAB on *P. aeruginosa* was related mainly to total PFs. Thus, the antibacterial activity would be largely connected to the botanical origin of the plant since the profile and amount of phenolic compounds influence the generation of ROS; which in turn participate in the inhibition of bacterial growth through oxidative damage. This action is modulated by other factors, such as iron, manganese, and copper.

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. Composición de la miel

La miel es un alimento que es parte de la dieta humana desde tiempos remotos. Siendo el componente principal los azúcares, que corresponden al 80% aproximado de los constituyentes y que le dan su característico sabor dulce (Viteri et al., 2021). Diferentes estudios han logrado identificar al menos 22 tipos de carbohidratos, siendo los más abundantes fructosa y glucosa (el Sohaimy et al., 2015). También cuenta con al menos 17% de agua y un 3% aproximado de otros componentes menores como proteínas, vitaminas, minerales y compuestos fenólicos. En una miel pura, además se puede encontrar polen, cera y algunas levaduras (Ferreira et al., 2009; Wang & Li, 2011).

La constitución de la miel está estrechamente relacionada con el origen botánico (flora circundante), factores geográficos, condiciones climáticas, además del proceso de producción, tiempo y condiciones de almacenaje del producto (Gül & Pehlivan, 2018). Estos últimos factores son relevantes ya que durante el almacenamiento pueden ocurrir reacciones que alteren la composición de la miel debido a la formación de productos poco deseados, como los que se generan de la reacción del grupo carboxilo de los azúcares reductores con los grupos amino libres de los aminoácidos presentes (Reacción de Maillard), lo cual se traduce en cambios en el color, aroma y sabor de la miel (da Silva et al., 2016).

Entre los componentes menores se reportan que prolina es el aminoácido más abundante, el cual tiene su origen en el néctar recolectado y en la saliva de las abejas. La presencia de este aminoácido se puede utilizar como indicador de madurez y alteración, además de ser un indicativo del metabolismo de las abejas (Engin Gündoğdu et al., 2019).

El ácido orgánico predominante es el ácido glucónico que se forma a partir de la oxidación de la glucosa catalizado por la enzima glucosa oxidasa (GOX) que aportan las abejas al depositar el néctar para su maduración, obteniéndose como productos dicho ácido y peróxido de hidrógeno, que actúa previniendo el crecimiento microbiano cuando aún la concentración de carbohidratos es baja. Este H_2O_2 es uno de los agentes responsable de la acción antibacteriana (Brudzynski et al., 2011).

En cuanto a la presencia de elementos, se han identificado macroelementos (Ca, K, Mg, Na, P), microelementos (As, B, Ba, Cu, Fe, Mn, Se, Sr, Zn) y elementos traza (Al, Cd, Ni), algunos de los cuales son importantes en la dieta humana, ya que juegan un importante rol en procesos enzimáticos y funciones corporales. Por otra parte, la presencia de estos elementos es indicativo del tipo de suelo donde crecieron las plantas cuyo néctar y polen fueron recolectados, pudiendo ser utilizado como indicativos y certificar el origen botánico y geográfico de una miel, o también como indicador de contaminación (Mejías & Garrido, 2017). Al contrario de los compuestos orgánicos que constituyen la miel, los elementos no se ven afectados por agentes oxidantes, exposición a la luz o calor (Oliveira et al., 2019).

Otro grupo de constituyentes importante que conforman la miel son los compuestos fenólicos, que corresponden a metabolitos secundarios que provienen de las plantas. Estos compuestos se caracterizan por tener al menos un anillo aromático sustituido por un grupo alcohol, describiéndose más de 10.000 compuestos, los que se clasifican según su estructura química en flavonoides y no flavonoides (da Silva et al., 2016). Algunos de estos polifenoles se utilizan para diferenciar el origen botánico de la miel: como el kaempferol que se ha usado como marcador de miel de romero, la quercetina como marcador de miel de maravilla o los derivados del ácido hidroxicinámico, que funcionan como marcadores de las mieles de castañas o avellanas (Viteri et al., 2021). compuestos de los cuales se ha reportado actúan como antioxidantes. Los polifenoles logran transferirse desde las plantas a la miel por medio del polen y néctar (Zhu et al., 2019).

En cuanto a vitaminas, se comprobó la presencia del complejo vitamínico B (B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9) y de la Vitamina C en diferentes mieles, los estudios se han centrado principalmente en el efecto antioxidante que posee el ácido ascórbico (da Silva et al., 2016; Sakihama, 2002).

1.2.-La miel como alternativa de terapia antibacteriana.

El desarrollo tecnológico y el descubrimiento de cómo combatir enfermedades infecciosas provocadas principalmente por bacterias, que históricamente han generado epidemias, se ha traducido en un aumento en la esperanza de vida para la humanidad. Sin embargo, hoy en día nos encontramos que los antibióticos que hasta hace unos años servían para combatir a múltiples infecciones ya no surten el mismo efecto, esto a causa de la resistencia que presentan los microorganismos debido al abuso y mal uso de estos medicamentos (Kwakman & Zaat, 2012). Frente a este panorama y debido a la rápida propagación de patógenos resistentes a múltiples fármacos en todo el mundo, se necesitan con urgencia enfoques terapéuticos alternativos; siendo uno de ellos el uso de la miel, producto natural que tradicionalmente se ha utilizado en el tratamiento de heridas y enfermedades infecciosas (GRABEK-LEJKO et al., 2018) y que ha sido redescubierta por la comunidad científica como una alternativa al creciente reporte de resistencia que muestran los microorganismos a los tratamientos convencionales (Cilia et al., 2020).

La miel es un producto natural que se forma cuando la abeja del género *Apis mellifera*, recolecta el néctar y lo mezcla con sustancias propias de ella para depositarlo en la colmena por un tiempo determinado o hasta que alcance las condiciones propicias de maduración (Kwakman & Zaat, 2012). Durante este periodo los componentes de la miel participan en complejas reacciones que dan como resultado este valioso producto, que cuenta con múltiples propiedades beneficiosas para la salud humana (GRABEK-LEJKO et al., 2018); y como indican Cilia y col. (2020), por su versatilidad puede ser empleada como nutriente, medicamento o ungüento.

En los últimos años, varios estudios han demostrado la acción antibacteriana (bacteriostática y bactericida) de diferentes tipos de miel contra una gran variedad de bacterias patógenas Grampositivas y Gramnegativas (Brudzynski et al., 2011; Bucekova et al., 2019; GRABEK-LEJKO et al., 2018). Diversos factores contribuyen a la actividad antibacteriana de la miel, incluido el peróxido de hidrógeno, pH bajo, alta osmolaridad, metilglioxal (principalmente en la miel de manuka) y péptidos antimicrobianos como la defensina-1, así como también los polifenoles, factores que se ven afectados principalmente por las condiciones climáticas, geográficas y botánicas en donde esté ubicada la colmena (Kwakman & Zaat, 2012; Strelec et al., 2018).

Entre las mieles con una potente actividad antibacteriana destaca la miel de Manuka, producida a partir del néctar del arbusto *Leptospermum scoparium* originario de Nueva Zelanda (Kwakman & Zaat, 2012). Entre los constituyentes de esta miel se encuentran el metilglioxal, fitoquímico responsable de su capacidad antibacteriana, lo que la hace única (Majtan et al., 2021) y una de las pocas mieles que se han convertido en productos médicos certificados para su uso (Roshan et., al. 2017). Además de la actividad antibacteriana, se ha demostrado que la miel posee actividad antiviral. En este sentido Watanabe et al., (2014) indican que la miel en general, y particularmente la miel de Manuka, tienen una potente actividad inhibitoria contra el virus de la gripe, lo que demuestra su posible valor medicinal para combatirlo. Así mismo,(Shahzad & Cohrs, 2012) mostraron que la miel tiene una importante actividad contra el virus de la varicela *in vitro*; con lo cual concluyen que dado lo simple de su aplicación en la piel, la miel puede ser un excelente remedio para tratar la erupción por herpes zoster en los países en desarrollo, donde los medicamentos antivirales son caros o no están fácilmente disponibles.

1.3.- Rol de los polifenoles y microelementos en la propiedad antibacteriana de la miel.

Desde los tiempos de Jesús, relatados en la Biblia e incluso en el Corán, se ha utilizado la miel como tópico antiséptico por su acción antimicrobial. Hoy en día, este producto de la apicultura es una alternativa de tratamiento a la resistencia que han desarrollado los microorganismos a las terapias tradicionales.(GRABEK-LEJKO et al., 2018) Se considera que la actividad antibacteriana de la miel se debe en gran parte al H₂O₂ y al péptido antimicrobiano defensina-1 (péptido catiónico, rico en cisteínas, formado por 51 aminoácidos con una masa de 5525 Da; con actividad principalmente contra bacterias Grampositivas) presentes en ella (Bucekova et al., 2019; Farkasovska et al., 2019; Strelec et al., 2018). El peróxido de hidrógeno es generado como subproducto de la oxidación de glucosa a ácido glucónico por parte de oxígeno, reacción catalizada por la enzima glucosa oxidasa (GOX). Cabe señalar que tanto la defensina-1 como la glucosa oxidasa son producidas por las abejas en sus glándulas hipofaríngeas y depositados en la miel (Bucekova et al., 2019; Strelec et al., 2018).

Estudios recientes han demostrado que el H₂O₂ presente en la miel está involucrado en el daño oxidativo y degradación del ADN bacteriano, observándose este efecto a bajas concentraciones de peróxido en la miel, como reportan diversos estudios de diferentes lugares del mundo, estas acumulan entre 0,8 y 58 ug de H₂O₂/gramo de miel, siendo concentraciones inferiores a lo mínimo necesario en el caso de que se aplicara solamente peróxido de hidrogeno.; sugiriendo la participación de otros componentes de la miel con un efecto potenciador de dicho proceso oxidativo. (Brudzynski et al., 2011).

El estudio realizado por Grabek-Lejko y col. (2018), reporta la existencia de una correlación entre la actividad antibacteriana de la miel, el contenido de peróxido de hidrógeno y los polifenoles. Así también lo demostraron Bucekova y col. (2019), quienes reportan que la actividad antibacteriana está relacionada con el contenido de H₂O₂ y polifenoles, pero no directamente con el contenido de GOX en la miel. Por lo tanto, existiría una vía alternativa no enzimática por la cual se generaría H₂O₂, en que estarían involucrados los polifenoles (flavonoides y ácidos fenólicos) y otros componentes menores de la miel y que sería más relevante que la vía catalizada por GOX. En este sentido se ha demostrado la generación de H₂O₂ por parte de diferentes polifenoles consumidos habitualmente en la dieta y en extractos de té incubados a 37°C, donde trazas de iones metálicos, tal como iones de cobre, manganeso, zinc, hierro, entre otros, presentes en los medios de incubación tendrían un papel relevante en la generación de H₂O₂; reportándose además a la quercetina (habitualmente presente en la miel) entre los compuestos más activos. Por otra parte, cabe señalar que recientemente Cebrero y col. (2020) demostraron que los compuestos fenólicos y los productos de Maillard presentes en la miel están relacionados con la producción de peróxido de hidrógeno sostenida en el tiempo (3 a 24 horas); favoreciendo así la actividad antibacteriana de la miel, principalmente contra *Staphilococcus aureus*.

Por otra parte, algunos estudios han evidenciado que los polifenoles presentes en la miel actuarían como intermediarios en la generación de ROS; y que esta acción prooxidante sería modulada por la presencia de iones como Cu (II) y Fe (III), obteniéndose como productos peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, este último con alto poder oxidativo sobre el ADN bacteriano causando su degradación.

Los polifenoles presentes en la miel provienen del néctar que las abejas recolectan desde la flora circundante a la colmena. En este sentido, se ha descrito que la oxidación de polifenoles

provenientes de plantas (fitofenoles) genera radicales superóxidos (O_2^-) y H_2O_2 que en presencia de hierro y cobre (Cu I y Fe II) dan lugar a la formación del radical hidroxilo, a través de una reacción de Fenton o tipo Fenton, especie que posteriormente, reacciona oxidando las moléculas de desoxirribosa. Se ha propuesto que diversos compuestos fitofenólicos, como los flavonoides y los ácidos dihidroxicinámicos, pueden dañar el ADN mediante la producción de radicales hidroxilos en presencia de cobre (II) y O_2 , de acuerdo con una serie de reacciones que se muestran en la Figura 1 (Sakihama, 2002). La oxidación inicial de catecoles por Cu (II) genera una semiquinona (reacción 1), que puede reaccionar con O_2 para formar $O_2^{\bullet-}$ (reacción 2). Esta reacción es autocatalítica ya que $O_2^{\bullet-}$ oxida el compuesto original para regenerar la semiquinona y H_2O_2 (reacción 3). El H_2O_2 también puede formarse por la desproporción de $O_2^{\bullet-}$ (reacción 4). En presencia de Cu (I), el H_2O_2 se convierte rápidamente en el radical $\bullet OH$ en una reacción de tipo Fenton (reacción 5). La presencia del anillo catecol en los compuestos fenólicos resulta ser relevante para su acción prooxidante en la generación de ROS.

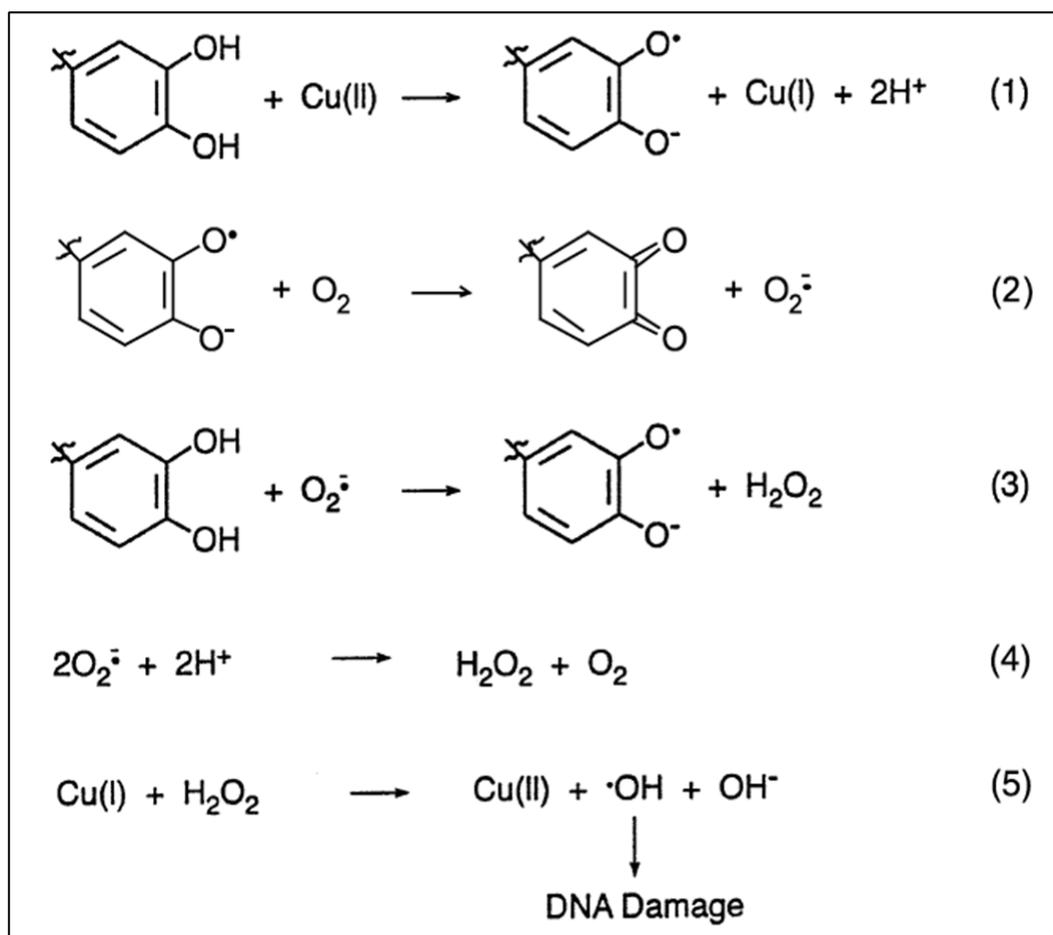


Figura 1. Mecanismo de reacción de polifenoles actuando como agentes prooxidantes en presencia de Cu^{2+} y O_2 . (Sakihama, 2002).

Estos antecedentes ponen en evidencia la importancia que tendrían los compuestos fenólicos de origen vegetal de la miel, en asociación con cationes como Cu^{2+} y Fe^{3+} , en la actividad antibacteriana de este producto; particularmente aquellos que presenten un anillo catecol en su estructura. Entre estos compuestos se pueden incluir los ácidos fenólicos gálico y caféico y los flavonoles quercetina y miricetina (Figura 2); cuya presencia en la miel ya ha sido reportada (Socha et al., 2011), los que podrían estar relacionados con su actividad antibacteriana. En este sentido cabe señalar que ha sido reportada la capacidad de flavonoides y ácidos fenólicos para generar radicales hidroxilos dependientes de Cu (II) y causar la escisión de la cadena de ADN, siendo miricetina, quercetina y ácido cafeico los más activos (Ahmad et al., 1992; Li & Trush, 1994; Rahman et al., 1989).

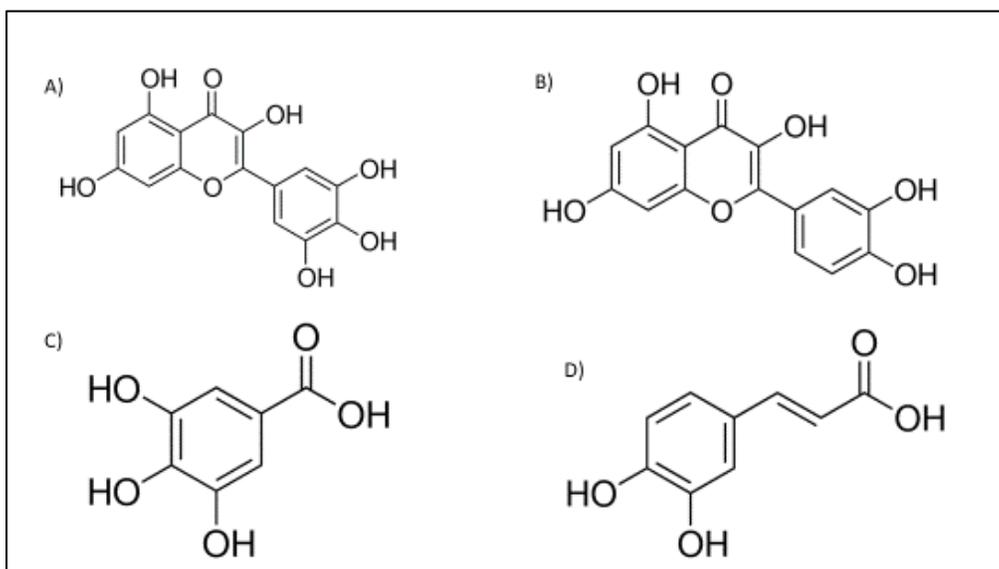


Figura 2. Estructura de los flavonoles miricetina (A) y quercetina (B), además de los ácidos fenólicos: ácido gálico (C) y ácido caféico (D). Imágenes catálogo Sigma-Aldrich (2020).

Con relación a los mecanismos involucrados en la generación de peróxido de hidrógeno por parte de la quercetina, se ha reportado el incremento de su autooxidación en presencia de Cu (II), con el consiguiente aumento en la producción de peróxido de hidrógeno (Hajji y col., 2006). Los autores proponen como mecanismo en primer lugar la rápida formación de complejos entre la quercetina con Cu (II) y/o Cu(I) favorecida a pH básico; la posterior oxidación del flavonoide por el Cu (II) (mediante una transferencia electrónica intramolecular del complejo) y luego su lenta autooxidación en presencia de oxígeno, obteniéndose peróxido de hidrógeno como producto, tal como se muestra en el esquema de reacciones propuesto por estos autores (Figura 3).

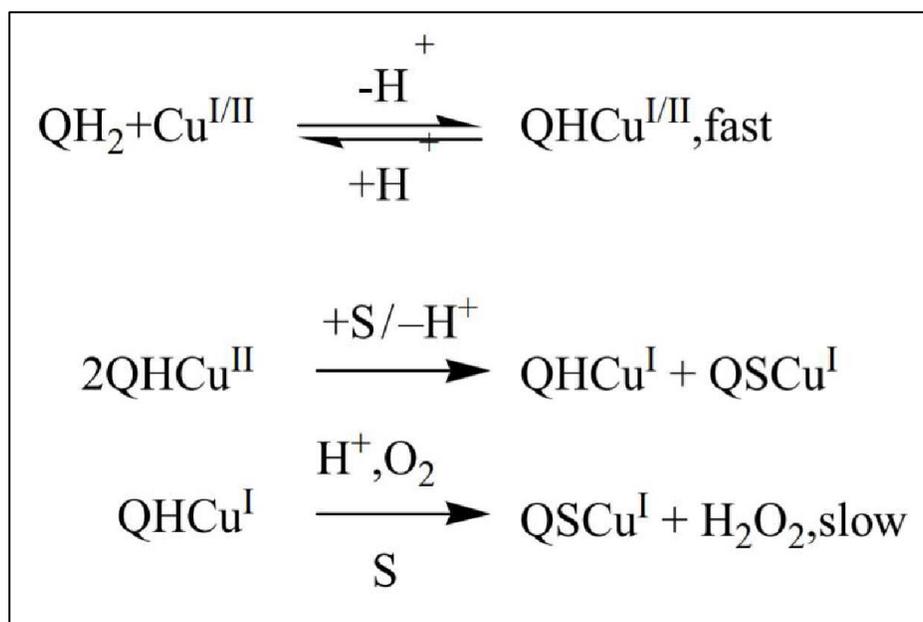


Figura 3 Mecanismo propuesto para la autooxidación de quercetina por Cu (II) y/o Cu (I) QH₂: quercetina; QHCu I/II: complejo entre quercetina y Cu (II) o Cu (I); QSCu I: complejo entre quercetina oxidada y Cu(I). (Hajji et al., 2006).

En este sentido, se ha reportado que la mayoría de los flavonoides pueden quelar los iones cúpricos; sin embargo, en condiciones más competitivas, solo las flavonas y los flavonoles pueden quelar tanto los iones cúpricos como los cuprosos. Los sitios de quelación de cobre más eficientes serían el grupo 3-hidroxi-4-ceto en los flavonoles y el grupo 5,6,7-trihidroxilo en las flavonas (Riha y col., 2014). Los citados mecanismos podrían estar operando en la miel, donde la formación de complejos entre el Cu (II) y/o Cu(I) y los flavonoides resultaría relevante para las posteriores reacciones de óxido-reducción y la producción de ROS; más aún si flavonas como la apigenina y crisina; y flavonoles como quercetina, kaempferol y miricetina (Figura 4) se encuentran habitualmente en la miel (Dimitrova et al., 2007; Ferreira et al., 2009; Socha et al., 2011).

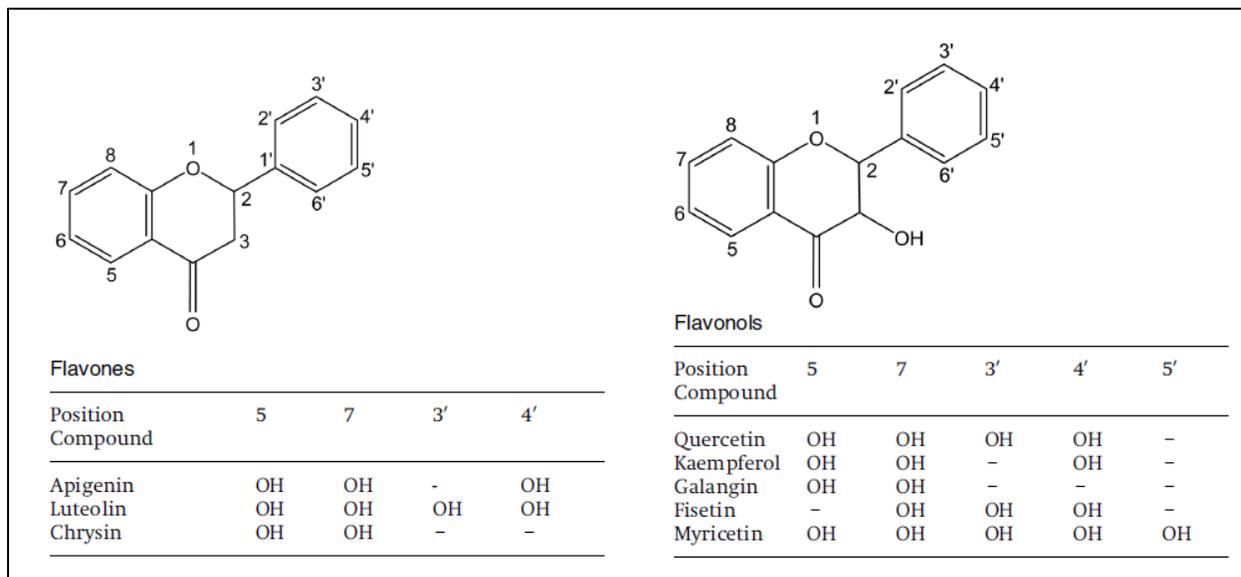


Figura 4. Flavona y flavonoles, y sus patrones de sustitución. (Stalikas, 2007).

Si bien los antecedentes expuestos aportan información sobre el rol que tendrían diferentes componentes de la miel en su actividad antibacteriana; las relaciones existentes entre estos, particularmente entre polifenoles, iones metálicos y la generación de ROS, continúan siendo materia de estudio. Existe entonces una relación compleja entre los diferentes componentes de la miel y su actividad antibacteriana. Esto lleva a plantear que la variación en las concentraciones de H_2O_2 , $OH\cdot$, compuestos fenólicos y cationes de metales de transición presentes en la miel determinan de forma multifactorial su actividad antibacteriana, estudio inexplorado hasta el momento. En consecuencia, en el presente proyecto se evaluó la relación multifactorial entre estos componentes y la actividad antibacteriana de la miel. Para ello, se estudió un grupo de 26 mieles de la zona central de Chile, al que se le determinó el contenido de compuestos fenólicos, H_2O_2 , radical hidroxilo, cobre, hierro, manganeso y cinc; y su actividad antibacteriana contra *Staphilococcus epidermidis* y *Pseudomona aeruginosa*. Posteriormente, se evaluaron las interrelaciones entre los componentes determinados y la actividad antibacteriana de la miel mediante análisis multivariado, empleando análisis de componentes principales y regresión sobre mínimos cuadrados parciales.

2. HIPÓTESIS

La variación en las concentraciones de H_2O_2 , $OH\bullet$, compuestos fenólicos y cationes de metales de transición presentes en la miel determinan de forma multifactorial su actividad antibacteriana.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos generales

Evaluar la relación entre la actividad antibacteriana de la miel, la producción de H_2O_2 y $OH\bullet$ y los contenidos de compuestos fenólicos, cobre, hierro, manganeso y cinc.

3.2 Objetivos específicos

- 1.- Evaluar el contenido de polifenoles y flavonoides totales y específicos (ácido gálico, ácido caféico, ácido cumárico, ácido siríngico, ácido ferúlico, rutina, apigenina, crisina, kaempferol, quercetina, miricetina y ácido clorogénico) y del pH en muestras de miel de la zona central de Chile.
- 2.- Determinar la concentración de H_2O_2 y del radical hidroxilo en función del tiempo de incubación en muestras de miel de la zona central de Chile.
- 3.- Determinar el contenido de cobre, hierro, manganeso y cinc en muestras de miel de la zona central de Chile.
- 4.- Evaluar la actividad antibacteriana de muestras de miel de la zona central de Chile contra *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomona aeruginosa*.
- 5.- Establecer la existencia de correlaciones entre los compuestos químicos de la miel y su actividad antibacteriana mediante análisis multivariado.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Estándares

- Apigenina $\geq 95\%$ pureza. Sigma- Aldrich
- Kaempferol $\geq 90\%$ pureza. Sigma- Aldrich
- Crisina. Sigma- Aldrich
- Rutina hidrato $\geq 94\%$. Sigma- Aldrich
- Acido cafeico. Sigma-Aldrich
- Quercetina $\geq 95\%$. Sigma-Aldrich
- Ácido gálico $\geq 98\%$ pureza. Sigma- Aldrich
- Ácido siringico $\geq 95\%$. Sigma-Aldrich
- Ácido clorogénico $\geq 95\%$. Sigma-Aldrich
- Ácido p-cumárico $\geq 98\%$ pureza. Sigma-Aldrich
- Ácido ferúlico $\geq 99\%$ pureza. Sigma-Aldrich
- Miricetina $\geq 96\%$ pureza. Sigma- Aldrich

4.1.2. Solventes

- Acetonitrilo para cromatografía en fase líquida. LiChrosolv
- Metanol para cromatografía en fase líquida. Supelco.

- Etanol para cromatografía en fase líquida. Supelco.
- Ácido fórmico 98-100% p.a. EMSURE® ACS, Reag. Ph Eur
- Ácido clorhídrico 37% m/v para análisis. Supelco.
- Ácido nítrico 65% suprapur. Supelco.
- Peróxido de hidrogeno 30% v/v. Merck

4.1.3 Reactivos

- 5,5-dimetilpirrona-N-oxido. Santa cruz Biochtechnology.
- Orto-dianisidina 95%. Sigma-Aldrich.
- peroxidasa 150 U/mg. Sigma-Aldrich.
- Buffer fosfato. Grado analítico, Merck.
- Cloruro de aluminio 99%. Sigma-Aldrich
- Carbonato de sodio para análisis. Supelco.
- Reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu, para análisis. Supelco.
- Proteinasa K (de Tritirachium album) purificada por cromatografía liofilizada 30 mAnson-U/mg para fines bioquímicos y para biología molecula. Sigma-Aldrich.
- Cobre (II) sulfato pentahidrato para análisis. Supelco.
- Hierro (II) sulfato heptahidrato para análisis. Supelco

4.1.4 Materiales

- Materiales de vidrio de uso general y volumétrico clase A.
- Micropipeta de desplazamiento de aire 20-200 μL , 100-1000 μL y 10000 μL
- Viales de vidrio ámbar, tapa rosca y contratapa de teflón.

- Tubos de ensayo de vidrio.
- Papel filtro.
- Pipetas microcapilares de vidrio 100 μ L.

4.1.5 Equipos

- Balanza analítica modelo 405M-200AS (\pm 0,001 g), Precisa.
- Balanza de precisión modelo 4000C (\pm 0,00001 g), Precisa.
- pHmetro Oakton (Vernon Hills, USA) modelo pH 1100.
- Centrífuga Orto alresa, modelo DIGICEN 21-R, 230-220 v 50-60 Hz.
- Microondas Milestone MLS-1200 MEGA, equipado con rotor de polipropileno de 10 vasos de TMF (Tetrafluormethaxil).
- Espectrofotómetro UV-Vis Agilent Technologies, modelo Cary 8454, equipado con detector de arreglo de diodos.
- Sistema HPLC Waters Alliance, modelo 2695, equipado con detector de diodos modelo Waters 996 Photodiode Array Detector y de fluorescencia, modelo Waters 2475 Multi λ Fluorescence Detector.
- Espectrómetro de Resonancia de Espín Electrónico, Bruker ECS 106 emplea una banda X (9,85 GHz) con una cavidad rectangular y modulación de la radiación de 50 kHz.
- Rotavapor Heidolph con baño termoregulado modelo WB2000; y regulador automático VV2000.
- Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente, modelo iCAP-RQ Serie: RQ01282, equipado con inyector automático modelo 4DX. Software Qtegra.

4.1.6 Software

- The Unscrambler v9.7, CAMO software AS., fue utilizado para realizar análisis por componentes principales PCA.

- STATGRAPHICS Centurion XVI v16.1.03, Stat Point Technologies, Inc., fue utilizado para análisis de datos.
- OriginPro9 v8.0724 (B724), OriginLab Corporation, fue utilizado para análisis de datos y obtención de gráficos.

4.1.7 Muestras

Se recolectaron 26 muestras de mieles de la zona central de Chile, de diversos orígenes geográficos y botánicos, distribuidas entre las regiones de Coquimbo y de Los Lagos (Figura 5) Las mieles fueron recolectadas en los periodos 2019-2020 y 2020-2021; además de algunas muestras recolectadas en el 2017. En la tabla 1, se muestra el detalle resumido de las muestras estudiadas.

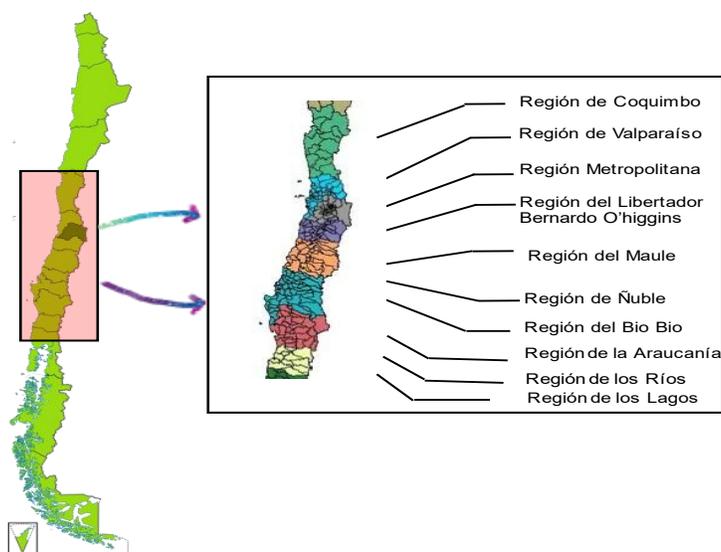


Figura 5. Mapa de Chile y localización de los sectores donde se obtuvieron las muestras de miel.

Tabla 1. Resumen de mieles estudiadas, según su origen geográfico, botánico y año de recolección.

<i>N°</i>	<i>Codificación</i>	<i>Tipo de miel</i>	<i>Ubicación geográfica</i>	<i>Año de recolección</i>
1	M1-IV	multifloral	Coquimbo	2019
2	M2-IV	Multifloral	Coquimbo	2019
3	M3-V	Multifloral	Valparaíso	2019
4	M4-V	Multifloral	Valparaíso	2019
5	M5-V	Multifloral	Valparaíso	2017
6	M6-V	Multifloral	Valparaíso	2021
7	M7-V	Multifloral	Valparaíso	2021
8	M8-RM	Ulmo	Metropolitana	2019
9	M9-RM	Quillay	Metropolitana	2019
10	M10-RM	Multifloral	Metropolitana	2019
11	M11-RM	Multifloral	Metropolitana	2019
12	M12-RM	Multifloral	Metropolitana	2019
13	M13-VI	Multifloral	De O'Higgins	2019
14	M14-VI	Multifloral	De O' Higgins	2019
15	M15-VI	Multifloral	De O' Higgins	2017
16	M16-VI	Multifloral	De O' Higgins	2017
17	M17-VII	Multifloral	Maule	2020
18	M18-VII	Multifloral	Maule	2020
19	M19-VII	Multifloral	Maule	2020
20	M20-VII	Flor de pradera	Maule	2020
21	M21-VII	Multifloral	Maule	2019
22	M22-IX	Multifloral	Araucanía	2019
23	M23-X	Multiflora	De los Lagos	2020
24	M24-X	Ulmo	De los lagos	2019
25	M25-X	Tiaca	De los lagos	2019
26	M26-X	Multifloral	De los lagos	2019

5. MÉTODOS

5.1 Determinación de pH

La determinación de pH de las mieles recolectadas se efectuó preparando una solución de miel al 10% p/v en agua purificada a temperatura ambiente como señalan Pascual-Maté et al., (2018) . La solución homogeneizada se procedió a medir utilizando el pH metro Oakton (Vernon Hills, USA) modelo pH 1100.

5.2 Determinación de contenido de polifenoles y flavonoides totales y específicos.

5. 2.1 Extracción de compuestos fenólicos desde la miel

Para extraer los compuestos fenólicos desde la miel se aplicó el método reportado por Zhu et al., (2019) con algunas modificaciones (figura 6). Este se denomina “sugaring-out assisted liquid-liquid extraction” (SULLE), y está basado en el fenómeno de partición de los analitos entre agua y acetonitrilo, favorecida por la elevada concentración de azúcares de la miel. En nuestro caso 1 g de miel se disolvió en 2 mL de agua acidificada con HCl 1M (pH 2.5), además se añadió 2 mL de acetonitrilo. La muestra fue agitada en vortex durante 1 minuto y posteriormente centrifugada por 10 minutos a 5000 rpm. Se separó el sobrenadante (acuoso) y nuevamente se agregaron 2 ml de ACN por segunda vez, se agitó y centrifugó, para posteriormente recuperar el sobrenadante que se juntó con el anterior, recuperando un volumen aproximado de 4 mL, el sobrenadante recuperado fue evaporado a sequedad en un rotavapor a 60°.

En el caso de la determinación de polifenoles mediante HPLC, la muestra fue reconstituida en 1 mL de fase móvil inicial (92% Agua y 8% ACN). Y en la determinación de polifenoles y flavonoides totales, la muestra fue resuspendida en un volumen final de 2,5 mL

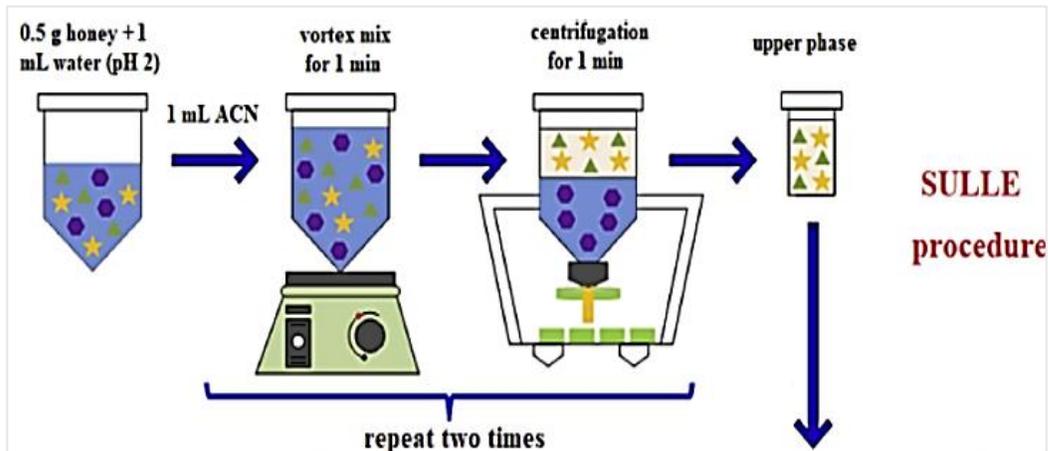


Figura 6. Metodología SULLE, desarrollada por Zhu et al., (2019)

5. 2.2 Determinación de Polifenoles y Flavonoides Totales

La determinación de los polifenoles totales (CPT) se realizó por medio del método colorimétrico de Folin- Ciocalteu, donde los complejos absorben a 765 nm. Los resultados se expresan en mg de equivalente de ácido gálico/g de miel (Tenore et al., 2012). Para la curva de calibración se dispuso una solución patrón de 2000 mg/L de ácido gálico, para luego preparar las distintas diluciones (25 mg/L, 50 mg/L, 75 mg/L, 100 mg/L, 125 mg/L). En matraces aforados de 5 mL se añadió 0,2 mL de estas diluciones o 0,2 mL de extracto de miel obtenido por el proceso SULLE, 2,5 ml de agua ultrapura y 0,25 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. Las concentraciones para el calibrado fueron finalmente 1, 3, 4 y 5 mg de equivalentes de ácido gálico/L. Se dejó reposar en oscuridad durante 3 minutos, transcurrido este tiempo, se añadió 0,5mL de NaCO_3 20% p/v y 1,55 ml de agua ultrapura. Finalmente, las muestras se dejan en oscuridad durante 1 hora antes de medir en el espectrofotómetro.

Para los Flavonoides totales (CFT), se utilizó el método descrito por Giordano y col. (2019). Los resultados obtenidos se expresaron en mg de equivalentes de Quercetina/ g de miel. La construcción de la curva de calibración se hizo utilizando la quercetina como solución patrón para lo cual se preparó una solución stock de 1000 mg/L (la solución se preparó en metanol/Agua al 70% v/v), luego se prepararon diferentes diluciones (4 mg/L ,8 mg/L, 12 mg/L, 16 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L) que corresponden a los puntos de la curva. En matraces aforados de

5 mL se añadió 2 ml de estas diluciones o 2 mL de extracto de miel obtenido por el proceso SULLE y 2 mL de una solución de AlCl_3 2% p/v (solución preparada en etanol); se completó el volumen con agua ultra purificada. Las muestras se dejaron en oscuridad y temperatura ambiente durante 1 hora antes de medir en espectrofotómetro a 432 nm. Se consideró la preparación de un blanco de muestra para descartar el color como interferente; el cual se preparó en un matraz de aforo de 5 ml, al que se añadió 3mL de agua ultrapura y 2 mL del extracto de miel. Los ensayos de determinación de polifenoles y flavonoides se efectuaron en duplicado

5.2.1.3 Determinación de compuestos fenólicos específicos

La determinación de los flavonoides y ácidos fenólicos de interés se efectuó por medio de cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), utilizando una columna C-18 (Agilent, Eclipse XDB-C18, 5 μm , 4,6 x 150 mm). 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 efectuó por medio de una gradiente que siguió el siguiente programa de elución: 0- 30min, 8% de (B), 30-32 min, 50% de (B), 32-38 min. 8% de (B) (se vuelve a las condiciones iniciales y mantiene, para estabilizarse y comenzar la siguiente muestra). Se inyectó 20 μL del extracto de miel obtenido por el proceso SULLE y los cromatogramas se registraron a 270 nm para los ácidos fenólicos y 360 nm para los flavonoides (Wang y col.,2019). 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 de 1000 mg/L en metanol, las cuales se utilizaron como stock para las diluciones que se utilizaron como puntos de la curva, que fueron de 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2mg/L, 4 mg/L, 6 mg/L, 8 mg/L. Para la determinación de los compuestos fenólicos específicos, se hicieron los análisis por duplicado.

5.3 Determinación de la acumulación de peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo en función del tiempo de incubación en muestras de miel.

5.3.1 Determinación de H₂O₂

La determinación del peróxido de hidrógeno acumulado en la miel se efectuó por el método colorimétrico basado en la formación de un cromóforo producto de la reacción de oxidación de la o-dianisidina catalizada por peroxidasa y su análisis por espectrofotometría UV-Vis (Kwakman et al., 2011; White & Subers, 1963).

Se prepararon soluciones de miel al 20% m/v en buffer fosfato 0,01M pH 6,5; las que fueron filtradas y almacenadas en viales ámbar, durante 24 horas a temperatura ambiente y oscuridad. Se evaluó la acumulación de peróxido de hidrógeno al tiempo inicial, 3 y 24 horas. Para su cuantificación, en un tubo de ensayo se agregaron 0,5 mL de la solución de miel al 20% m/v o de las soluciones patrón de peróxido de hidrógeno, 1,5 mL de buffer fosfato 0,01 M pH 6,5; 0,5 mL de solución de peroxidasa 0,025 mg/mL (7,5 UI/mL) (preparada a partir de solución stock de 0,5 mg/mL en el mismo buffer,(150 UI/mL)) y 0,25 mL de solución de orto-dianisidina 0,4 mg/mL (preparada a partir de una solución de 1 mg/mL en agua), ambas disoluciones fueron preparadas en buffer fosfato 0,01 M pH 6,5. La mezcla se agitó y se dejó reaccionar por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, posteriormente se midió la absorbancia a 444 nm. Todos los ensayos de acumulación de H₂O₂, se efectuaron en duplicado

Para la curva de calibrado, se utilizó como estándar una solución de H₂O₂ de concentración 333 mg/L, que se sirvió para preparar las diluciones patrones (2 mg/L, 4 mg/L, 6 mg/L, 8 mg/L, 10 mg/L, 12 mg/L, 14 mg/L) que corresponderán a los puntos de la curva.

5.3.2 Determinación de H₂O₂, inhibiendo acción de GOX.

Se utilizó la misma metodología propuestas por While y col. (1963) y Kwakman y col. (2011), en esta ocasión la solución de miel preparada al 20% m/v en buffer fosfato 0,01M pH 6,5; se añadió 0,250 uL de proteinasa K de concentración 1 mg/L con el objetivo de degradar las proteínas y así descartar el H₂O₂ generado por acción de la enzima GOX presente en la miel (Bucekova et al., 2019). Se evaluó la acumulación de peróxido de hidrógeno a las 3 y 24 horas de incubación; tal como se detalló en la sección anterior.

5.3.3 Determinación del radical hidroxilo.

La generación del radical hidroxilo en las mieles se efectuó mediante la técnica de resonancia de espín electrónico (REE) utilizando la técnica de atrapamiento de espín (Spin trapping), siguiendo lo indicado por Márquez et al., (2019). Para ello se empleó 5,5-dimeltipirrona-N-óxido (DMPO) como atrapador de espín, que forma un spin-aducto más estable y con una vida media mayor a la del radical hidroxilo, facilitando su detección. En un eppendorf se mezclaron 100 uL de solución de miel 12,5% m/v preparada en agua ultrapura con 150 uL de DMPO 0,1M. La mezcla se agitó y se incubó por 10 minutos a 60°C. Posteriormente, la mezcla se colocó en la celda REE, y los espectros se registraron en un equipo Bruker ECS 106 con una banda X (9,85 GHz), y modulación de la radiación de 50 kHz. Los datos obtenidos fueron evaluados mediante el programa OriginPro9 v8.0724 (B724).

5.4.- Contenido de cobre y hierro.

Para la cuantificación de cobre y hierro las muestras de miel fueron mineralizadas para eliminar la materia orgánica. Esto se hizo por medio de digestión con microondas utilizando la metodología descrita por Taube et al., (2019) con modificaciones. 1 g de miel fue pesado en duplicado en los recipientes de teflón del microondas y se le añadió 2 mL de HNO₃ 63% p/p suprapuro® (Merck) y se dejó reposar la muestra durante toda la noche. Posteriormente se le añadió 2 mL de H₂O₂ 30% p/p, los vasos se cerraron y sometieron al siguiente programa de potencia: 80 W por 2 minutos, 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 ayuda de agua y el digerido y su duplicado fueron enrasado a 50 mL con agua destilada ultrapura. La cuantificación de los metales se realizó mediante ICP-MS. Cabe señalar que además de cobre y hierro se determinó igualmente cinc y manganeso.

5.5 Actividad antimicrobiana en miel

Las pruebas de susceptibilidad se realizaron contra *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*, que se cultivaron en caldo Luria-Bertani (LB) a 37°C y siguiendo el crecimiento bacteriano por medio de la densidad óptica del cultivo (OD) a λ 620 nm. Se utilizaron micro diluciones para la evaluación antibiótica, donde se diluyó la miel en el medio LB. las muestras se disolvieron en forma decreciente 1:2 v/v, 1:4 v/v, 1:8 v/v, 1:16 v/v, 1:32 v /v, 1:64 v/v. Para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC), con un 99,9% de inhibición. Las muestras se incubaron en microplacas de 96 pocillos por triplicado, donde se añadió 180 μ l de la dilución con 20 μ l de inóculo del cultivo bacteriano a una concentración de 5×10^5 UFC / ml, el cual se ajustó utilizando la escala estándar de turbidez de McFarland, para cada cepa. El control positivo estuvo compuesto de 20 μ L de cultivo bacteriano y 180 μ L de LB. Y un control negativo que tenía 200 μ L de medio LB. El crecimiento bacteriano se determinó a tiempo cero (T0) y 24 horas. Este análisis fue efectuado en el Instituto de ciencias e innovación en medicina (ICIM), de la Universidad del Desarrollo.

5.6 análisis de componentes principales y Regresión sobre mínimos cuadrados.

La matriz, se construyó conteniendo en las filas las muestras y en las columnas, los parámetros determinados para cada miel. Una vez reunida la información, la matriz fue sometida a análisis de componentes principales (PCA) para establecer correlaciones entre los factores estudiados (polifenoles y flavonoides totales, ácido gálico, ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido siríngico, ácido ferúlico, ácido clorogénico, quercetina, miricetina, kaempferol, rutina, crisina, apigenina radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, hierro y cobre) y la actividad antimicrobiana que presenta la miel (A.-R. A. Roshan et al., 2013). Además, se efectuó análisis de regresión sobre mínimos cuadrados parciales (PLS), donde se establecieron modelos predictivos de la actividad antibacteriana y/o generación de ROS, en función de los componentes analizados en la miel. Para su ejecución se utilizó el programa The Unscrambler v9.7, CAMO software AS.

6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1.- Evaluar el contenido de polifenoles y flavonoides totales y específicos (ácido gálico, ácido caféico, ácido cumárico, ácido siríngico, ácido ferúlico, rutina, apigenina, crisina, kaempferol, quercetina, miricetina y ácido clorogénico) y del pH en muestras de miel de la zona central de Chile.

6.1.1 pH de las muestras de miel

Como se observan en la tabla 2, las mieles tienen un pH que oscila entre 3,6 a 5,4; con un valor promedio de $4,4 \pm 0,4$, siendo la miel M5-V la que registra el pH más alto y la M6-V el más bajo. Estos valores son similares a los reportados por Fredes & Montenegro, (2006), quienes estudiaron mieles nacionales que abarcaban desde la IV a X región, en promedio estas tuvieron un pH $4,2 \pm 0,3$.

Tabla 2. Registro pH de mieles estudiadas.

<u>Mieles</u>	<u>pH</u>	<u>Mieles</u>	<u>pH</u>
M1-IV	4,78 ± 0,00	M14-VI	4,04 ± 0,02
M2-IV	4,07 ± 0,00	M15-VI	3,87 ± 0,00
M3-V	4,26 ± 0,01	M16-VI	4,38 ± 0,00
M4-V	5,27 ± 0,01	M17-VII	4,53 ± 0,02
M5-V	5,39 ± 0,01	M18-VII	4,12 ± 0,04
M6-V	3,70 ± 0,02	M19-VII	4,23 ± 0,01
M7-V	4,31 ± 0,01	M20-VII	4,65 ± 0,01
M8-RM	4,57 ± 0,01	M21-VII	4,23 ± 0,00
M9-RM	4,38 ± 0,01	M22-IX	4,37 ± 0,01
M10-RM	4,57 ± 0,02	M23-X	4,20 ± 0,00
M11-RM	4,49 ± 0,01	M24-X	3,83 ± 0,02
M12-RM	3,84 ± 0,00	M25-X	4,46 ± 0,01
M13-VI	4,72 ± 0,01	M26-X	4,29 ± 0,00

El pH ácido reportado de las mieles está estrechamente relacionado con la composición de esta, ya que contiene varios ácidos orgánicos; siendo el principal el ácido glucónico (pKa: 3,86), que se obtiene de la oxidación de la glucosa mediada por la glucosa-oxidasa (Majtan et al., 2021); siendo además uno de los factores que aportan a la actividad antibacteriana de la miel.

6.1.2 Contenido de polifenoles y flavonoides totales

Para determinar el contenido de los polifenoles y flavonoides totales y específicos (ácido gálico (GA), Ácido cafeico (CA), Ácido cumárico (pCA), Ácido siríngico (SA), Ácido ferúlico (FA), Quercetina (Que), Miricetina (Mir), Rutina (Rut), Apigenina (Api), Crisina (Cri), Kaempferol (Kae) y ácido clorogénico (CGA)) fue necesario efectuar la extracción de dichos compuestos desde las muestras de miel. Para ello se empleó la técnica de extracción SULLE (Sugaring-out assisted liquid-liquid extraction) descrita por Zhu et al., 2019, basada en una sencilla extracción líquido-líquido, en donde los polifenoles disueltos en una solución acuosa de miel acidificada son extraídos con acetonitrilo. La extracción se ve favorecida por la elevada concentración de azúcares, la miel está constituida aproximadamente en un 80% de azúcares de los cuales predominan glucosa y fructosa (Bogdanov et al., 2008); por lo cual la partición efectiva se logra con un 40% m/v de concentración de los azucares presentes en la miel, que producen el efecto “sugaring-out”, facilitando la partición de los analitos de interés hacia la fase orgánica. Para evaluar la eficiencia de extracción de la técnica SULLE; una muestra de miel fortificada con el flavonoide quercetina a 75 ug/g de miel fue sometida al procedimiento en duplicado y analizada mediante el método espectrofotométrico descrito en la metodología. El resultado se presenta en la tabla 3; obteniéndose la recuperación cuantitativa del analito.

Tabla 3. Ensayo de recuperación método SULLE

<i>Procedimiento de extracción</i>	% Recuperación	%RSD
SULLE	126%	1,26%

La cuantificación de polifenoles totales se llevó a cabo utilizando el método colorimétrico Folin- Ciocalteu, donde los complejos formados por la reacción de oxido-reducción absorben a 765 nm. La figura 7 muestra el contenido de polifenoles totales de las 26 muestras de mieles de la zona central del país. Los valores estuvieron comprendidos entre 34 y 175 ug equivalentes de GA/ gramo de miel; con un promedio de 108 ug equivalentes de GA/ gramo de miel. La muestra M10-RM es la que presentó el mayor contenido de polifenoles totales con 175 ± 3 ug equivalentes de GA/ gramo de miel.

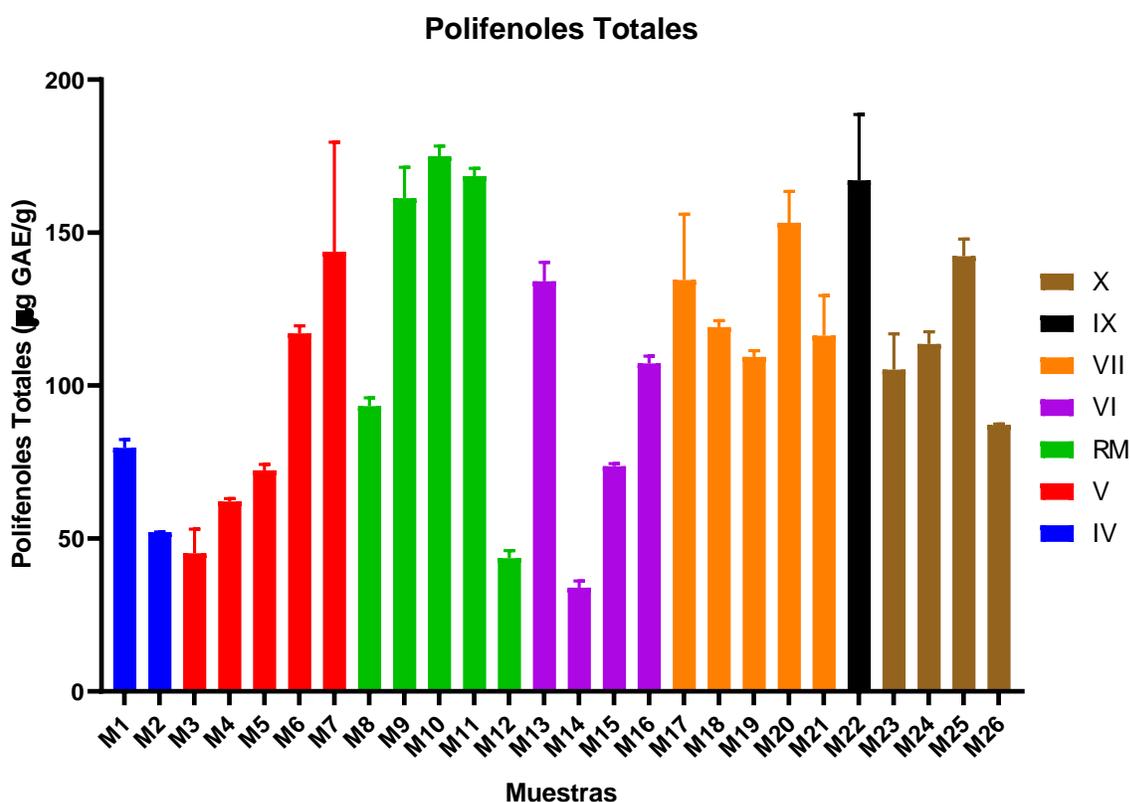


Figura 7. Contenido de polifenoles totales de las mieles estudiadas.

Los valores obtenidos de polifenoles totales son concordantes con los valores reportados por Giordano et al., (2019) , quienes han estudiado en detalle las mieles nacionales, reportan rangos de polifenoles totales entre 8 y 250 mg equivalentes de GA/ gramo de miel. Hay que tener en cuenta que el contenido de polifenoles de la miel se ve influenciado por múltiples factores tales como el origen geográfico, climático y botánico; lo que queda de manifiesto en el amplio

intervalo de valores encontrados entre las mieles analizadas. Sin embargo, se observan ciertas tendencias generales, con mayores contenidos de polifenoles en las mieles de la RM, VII, IX y X regiones. Por otra parte, cabe señalar que el método Folin- Ciocalteu no es una metodología selectiva por lo cual pueden estar reaccionando otros compuestos reductores no fenólicos, tal como algunos azúcares o aminoácidos, sobrevalorado el contenido (Ferreira et al., 2009). Sin embargo, dada la extracción previa de estos compuestos realizada en este caso a través de la técnica SULLE, estas interferencias deberían ser menores y los contenidos de polifenoles totales se acercaría a la realidad.

Para la determinación de los flavonoides totales se utilizó el método colorimétrico señalado por Giordano et al., (2019), con variaciones, donde el Al (III) forma un complejo con los flavonoides que absorben a los 432 nm. Como este complejo es de color amarillo, fue necesario hacer un blanco de muestra, para restar el efecto matriz de la miel. La figura 9 muestra el contenido de flavonoides totales de las 26 muestras de mieles de la zona central del país. Los valores estuvieron comprendidos entre no detectado y 8,6 ug equivalentes de Que/gramo de miel; con un promedio de 2,4 ug Que/gramo de miel. La miel M11-RM presentó el mayor valor con $8,6 \pm 0,2$ ug de equivalentes de Que/gramo de miel. Esta metodología colorimétrica funciona mejor para la determinación de flavonas y flavonoles, por lo cual el contenido de flavonoides totales se estaría subestimando (J. M. Alvarez-Suarez et al., 2010). Esta metodología considera el uso de la sal cloruro de aluminio, en donde el ion aluminio forma un complejo coloreado al reaccionar con los grupos hidroxil y carbonil del flavonoide, como se puede visualizar en la figura 8 los sitios de unión para los metales trazas (J. Alvarez-Suarez et al., 2009; Pietta, 2000)).

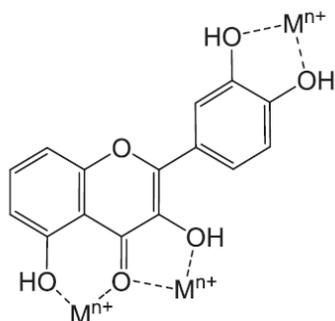


Figura 8. Sitios de unión para metales de transición que presenta la estructura de los flavonoides; lo que permite formar complejos con estos; los que absorben a longitudes de onda visible y además favorecen su autooxidación y actividad prooxidante.

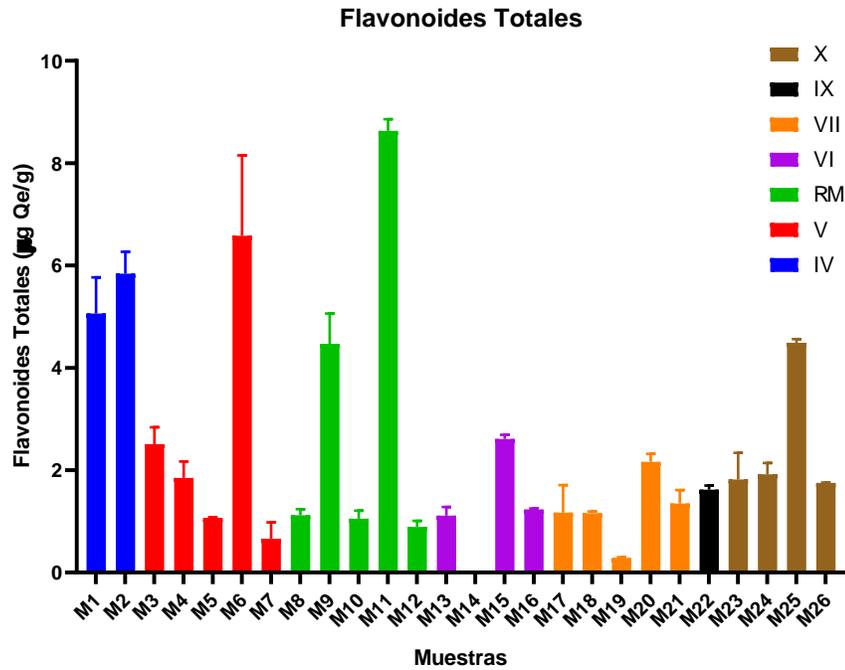


Figura 9. Contenido de flavonoides totales de las mieles analizadas.

A diferencia de lo observado para los polifenoles totales, en términos generales las mieles con mayor contenido de flavonoides provienen de las regiones del norte y centro del país, donde prevalece un clima mediterráneo, cuyos valles se caracterizan por tener altas temperaturas y baja humedad durante la primavera y verano. Esto se condice con lo descrito por Kenjeric et al., (2007) , quienes estudiaron el perfil de 40 mieles croatas e indican que el contenido de flavonoides se ve favorecido en estas condiciones climáticas.

6.1.3 Contenido de polifenoles y flavonoides específicos

La determinación de los flavonoides y ácidos fenólicos de interés se efectuó por medio de HPLC-DAD bajo las condiciones detalladas previamente. Las figuras 10.A y 10.B muestran los cromatogramas registrados a 270 nm para los ácidos fenólicos y 360 nm para los flavonoides, respectivamente. En ellos se aprecia una adecuada resolución para todos los compuestos en un tiempo de análisis de 39 minutos. En la tabla 4 se muestran las principales cifras de mérito analíticas obtenidas para la cuantificación de estos compuestos. Los valores de R^2 en el intervalo de concentraciones fue mayor o igual a 0,9942; con valores de LOQ comprendidos entre 0,001 y 0,019 ug/g.

Tabla 4. Principales cifras de méritos analíticas correspondiente a la cuantificación de ácidos fenólicos y flavonoides de interés en la miel mediante HPLC-DAD.

Compuesto	Tiempo de retención	R^2	S^a (mg/L)	LOQ ^b (ug/g)
Ácido gálico	2,80 min.	0,9998	0,0004	0,004
Ácido clorogénico	6,37 min.	0,9999	0,0012	0,012
Ácido cafeico	7,78 min.	0,9998	0,0006	0,006
Ácido siríngico	8,20 min.	0,9987	0,0002	0,002
Ácido p-cumárico	10,48 min.	0,9999	0,0009	0,009
Ácido ferulico	11,70 min.	0,9998	0,0007	0,007
Rutina	11,07 min.	1,0000	0,0019	0,019
Miricetina	14,75 min.	0,9993	0,0003	0,003
Quercetina	18,45 min.	0,9997	0,0004	0,004
Apigegina	21,26 min.	0,9942	0,0001	0,001
Kaempferol	21,90 min.	0,9963	0,0001	0,001
Crisina	28,60 min.	0,9998	0,0003	0,003

a: Sensibilidad analítica ($S y/x / b$) donde $S y/x$ es el error en la estimación y b la pendiente del calibrado. *b*: $LOQ = 10 (S y/x / b)$

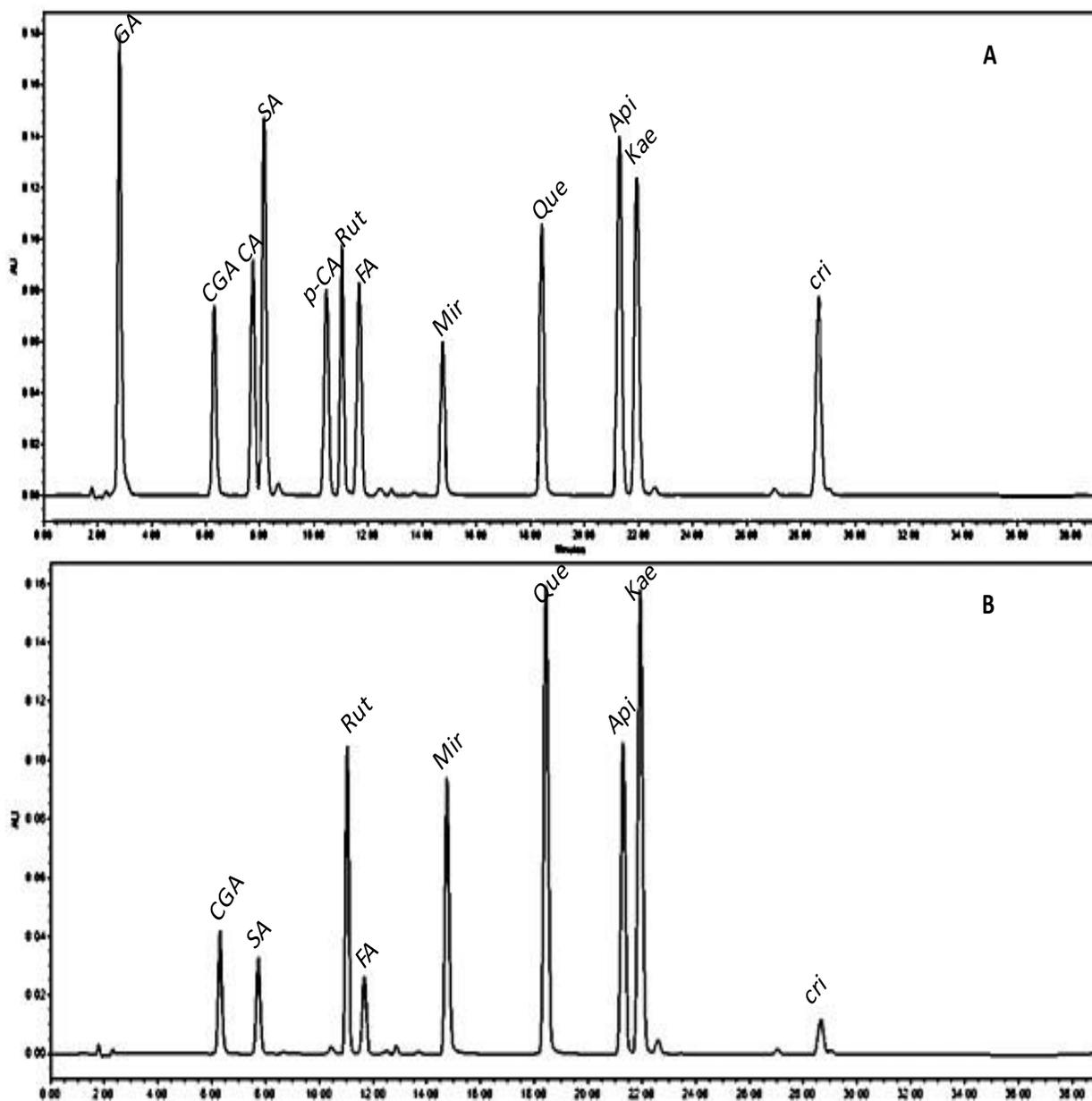


Figura 10. Cromatogramas HPLC-DAD de estándares a 270 nm (A) y 360 nm (B). (ácido gálico (GA), Ácido cafeico (CA), Ácido cumárico (pCA), Ácido siríngico (SA), Ácido ferúlico (FA), Quercetina (Que), Miricetina (Mir), Rutina (Rut), Apigenina (Api), Crisina (Cri), Kaempferol (Kae) y ácido clorogénico (CGA))

Para la determinación de los polifenoles específicos en las mieles estudiadas mediante HPLC-DAD se trabajaron en dos grupos: Grupo n°1: constituido por los ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido sirínico, ácido ferúlico y ácido clorogénico) cuya absorbancia se registró a 270 nm. Grupo n°2: constituido por los flavonoides (quercetina, kaempferol, rutina, miricetina, crisina y apigenina) cuya absorbancia se registró a 360 nm. Además, la identificación se efectuó por medio de la comparación del tiempo de retención y los espectros de absorción de cada estándar. En la figura 11 se presentan como ejemplo los cromatogramas obtenidos para las mieles M4-V y M16-VI, registrados a 270nm para la determinación de ácidos fenólicos. Dado su carácter de mayor hidrofiliía estos eluyeron antes que los flavonoides. En el caso particular de estas dos mieles se logró identificar ácido gálico, ácido sirínico, ácido p- cumárico y ácido ferúlico. Estos compuestos han sido descritos previamente en estudios de perfiles fenólicos de las mieles y son utilizados como marcadores botánicos o geográficos (Velásquez et al., 2020)

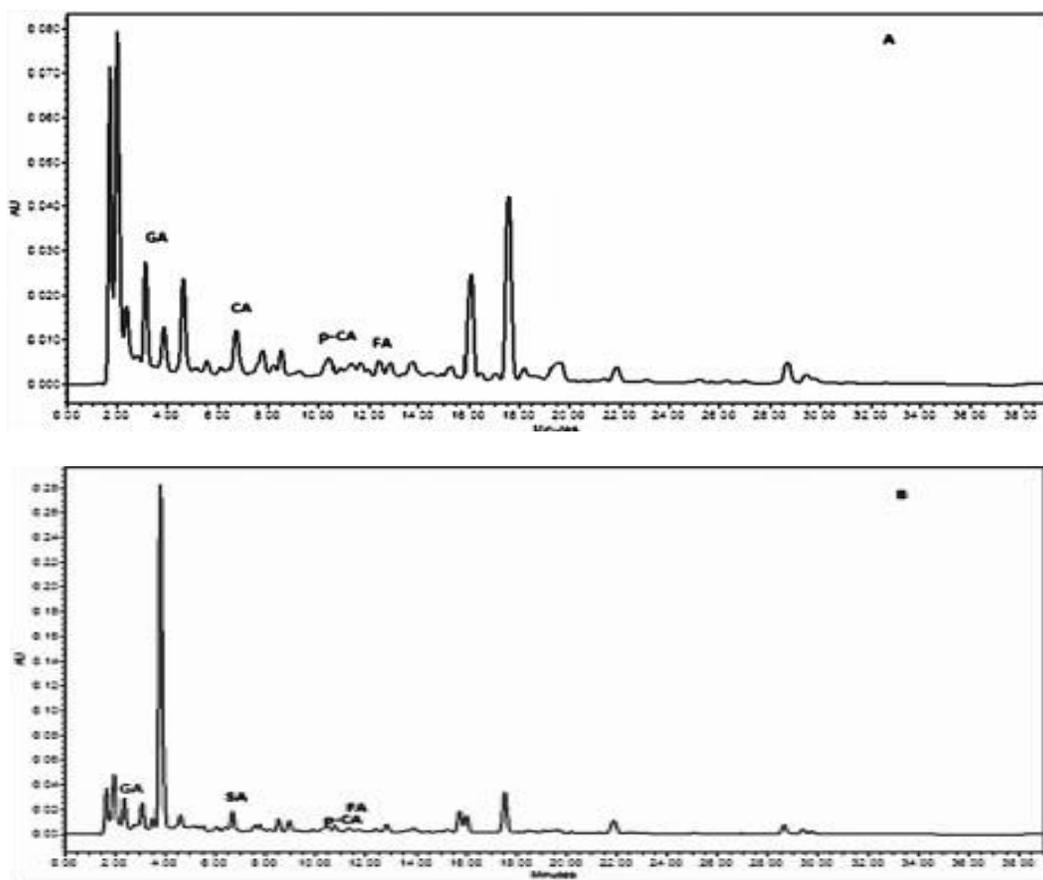


Figura 11. Cromatogramas HPLC-DAD de las mieles M4-V(A) y M16-VI (B), registrados a 270nm. (Para identificación de los PFs ver figura 10)

A continuación, en las figuras 12 y 13 se presentan los espectros de absorción de los patrones utilizados para la identificación de los ácidos fenólicos y flavonoides respectivamente.

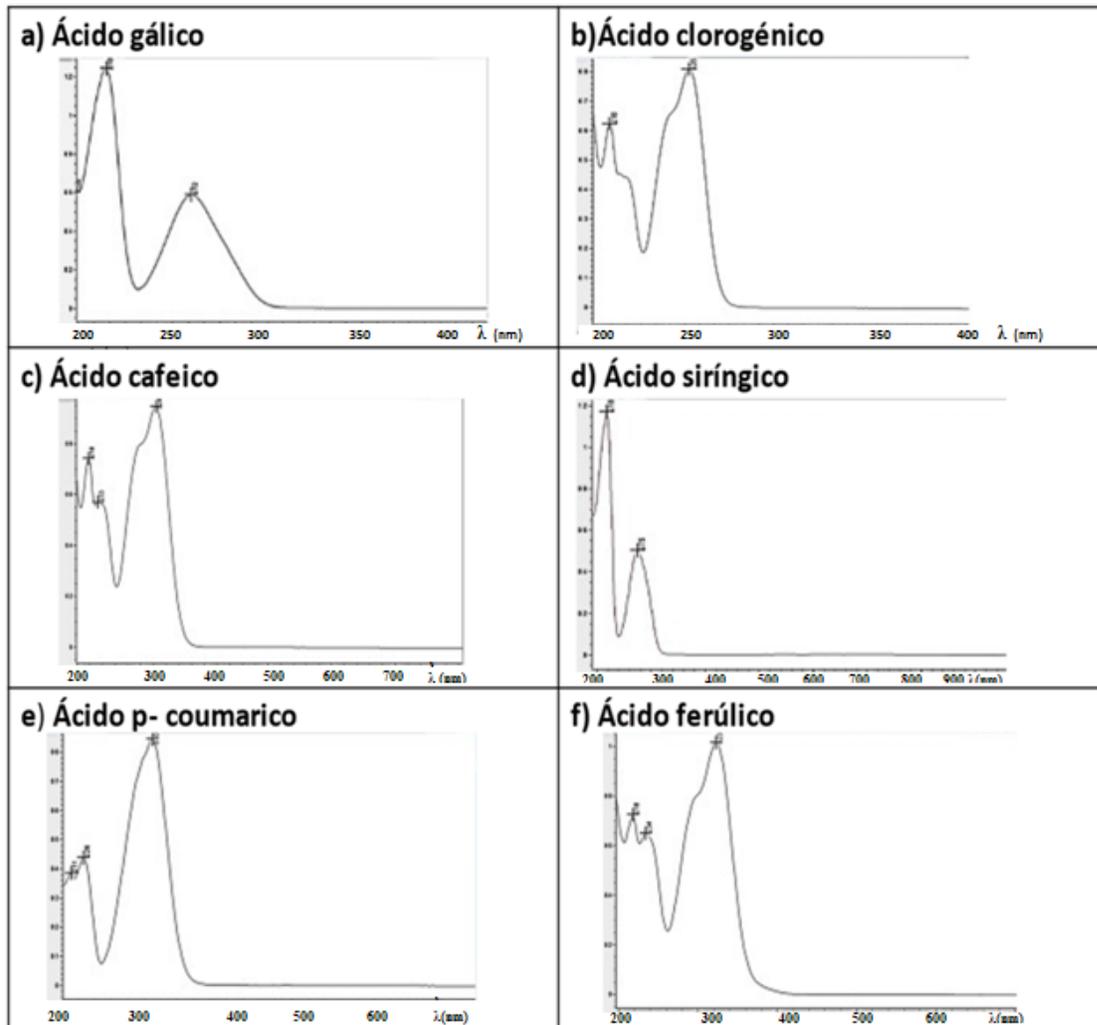


Figura 12. Espectros de absorción de los patrones de los ácidos fenólicos identificados en las mieles estudiadas.

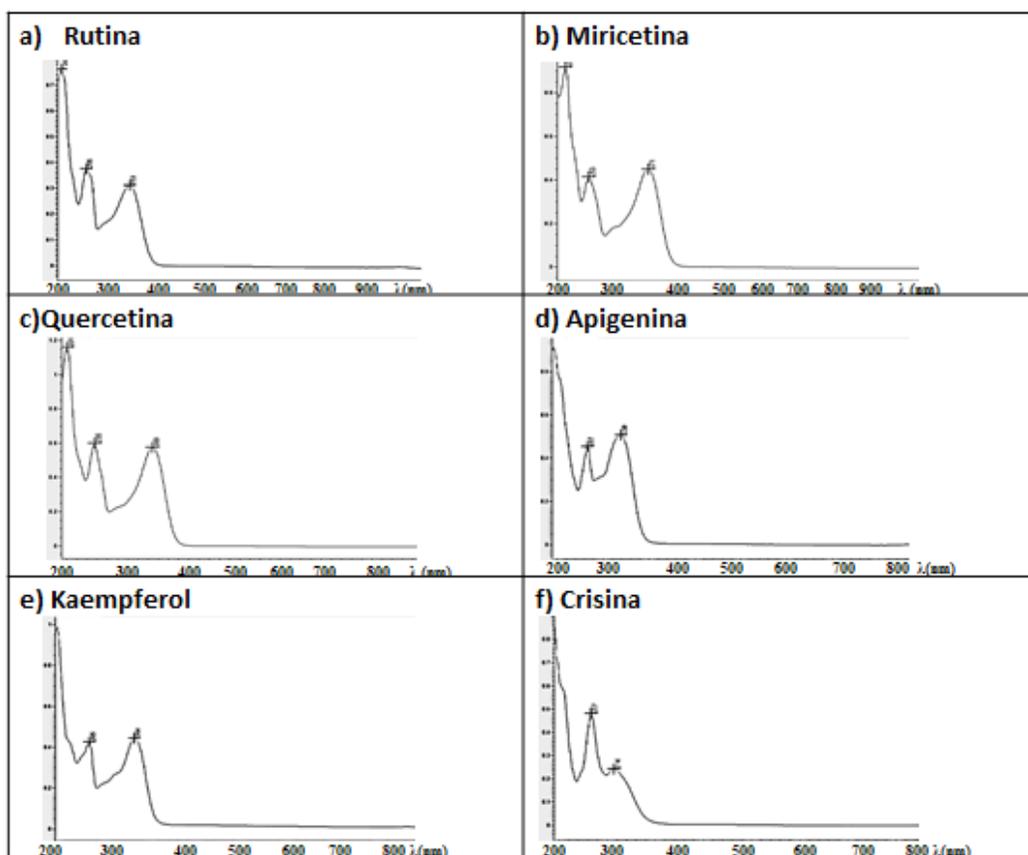


Figura 13. Espectro de absorción de los patrones de los Flavonoides identificados en las mieles analizadas

La tabla 6 resume los resultados del contenido de los polifenoles totales y ácidos fenólicos específicos en las 26 mieles analizadas, donde se observa que el ácido gálico y el ácido p-cumárico son los predominantes en las mieles nacionales. La frecuencia de aparición de los ácidos fenólicos de las mieles nacionales fue ácido gálico > ácido p-coumarico > ácido cafeico > ácido ferúlico > ácido siringico > ácido clorogénico. Además, el ácido gálico fue el que presentó las mayores concentraciones con un valor promedio de 5,7 ug /g de miel.

Tabla 5. Contenido de polifenoles totales ($\mu\text{g GAE/g}$ de miel) y ácidos fenólicos identificados ($\mu\text{g/g}$ de miel) en las mieles analizadas.

<i>Miel</i>	<i>Polifenoles totales</i>	<i>GA</i>	<i>CGA</i>	<i>CA</i>	<i>SA</i>	<i>p-CA</i>	<i>FA</i>
<i>M1-IV</i>	80 ± 3	4,0 ± 0,1	-----	-----	-----	1,7 ± 0,6	-----
<i>M2-IV</i>	52 ± 1	5,0 ± 0,1	-----	-----	-----	1,3 ± 0,2	-----
<i>M3-V</i>	45 ± 8	5,0 ± 0,1	-----	-----	0,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1	-----
<i>M4-V</i>	62 ± 1	1,0 ± 0,1	-----	2,2 ± 0,1	-----	1,9 ± 0,1	0,5 ± 0,1
<i>M5-V</i>	72 ± 2	0,5 ± 0,1	-----	-----	-----	-----	-----
<i>M6-V</i>	117 ± 3	48 ± 2	0,6 ± 0,1	-----	-----	0,1 ± 0,1	-----
<i>M7-V</i>	144 ± 36	6 ± 1	-----	-----	-----	1,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1
<i>M8-RM</i>	93 ± 3	2,4 ± 0,2	-----	-----	-----	-----	-----
<i>M9-RM</i>	161 ± 10	7,4 ± 0,4	-----	-----	-----	1,3 ± 0,1	-----
<i>M10-RM</i>	175 ± 3	2,5 ± 0,1	-----	-----	-----	1,8 ± 0,1	-----
<i>M11-RM</i>	169 ± 3	2,8 ± 0,1	-----	-----	-----	-----	-----
<i>M12-RM</i>	44 ± 2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>M13-VI</i>	134 ± 6	2,8 ± 0,2	-----	0,7 ± 0,1	-----	-----	-----
<i>M14-VI</i>	34 ± 2	4,4 ± 0,7	-----	-----	-----	0,5 ± 0,1	-----
<i>M15-VI</i>	74 ± 1	7,2 ± 0,6	-----	-----	-----	-----	-----
<i>M16-VI</i>	107 ± 2	3,0 ± 0,1	-----	-----	1,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,3 ± 0,1
<i>M17-VII</i>	135 ± 21	9,7 ± 0,7	-----	-----	-----	-----	-----
<i>M18-VII</i>	119 ± 2	5,1 ± 0,2	-----	-----	-----	1,6 ± 0,1	-----
<i>M19-VII</i>	109 ± 2	4,5 ± 0,3	-----	-----	-----	-----	-----
<i>M20-VII</i>	153 ± 10	6,2 ± 0,1	-----	1,3 ± 0,1	-----	1,3 ± 0,1	-----
<i>M21-VII</i>	116 ± 13	3,3 ± 0,2	-----	0,9 ± 0,1	-----	1,1 ± 0,1	-----
<i>M22-IX</i>	167 ± 22	3,3 ± 0,1	-----	0,4 ± 0,1	-----	0,6 ± 0,1	-----
<i>M23-X</i>	105 ± 12	5,3 ± 0,1	-----	-----	-----	0,8 ± 0,1	-----
<i>M24-X</i>	114 ± 4	3,4 ± 0,1	-----	-----	-----	-----	-----
<i>M25-X</i>	142 ± 6	2,9 ± 0,1	-----	-----	-----	-----	-----
<i>M26-X</i>	87 ± 1	0,8 ± 0,1	-----	-----	-----	-----	-----
<i>LOQ</i>		0,004	0,012	0,006	0,002	0,009	0,007

En la figura 14 se exhibe como ejemplo el cromatograma obtenido para la miel M9-RM, registrado a 360 nm para la determinación de flavonoides; la que presentó cinco de los seis flavonoides en estudio, reconociéndose la presencia de rutina, miricetina, quercetina, kaempferol y crisina. Por otra parte, la tabla 7 resume los resultados del contenido de los flavonoides totales y específicos en las 26 mieles analizadas. La frecuencia de aparición de los flavonoides fue de mayor a menor: quercetina, crisina, kaempferol, apigenina, y rutina. Estos resultados, se encuentran en concordancia con lo publicado por Velásquez et al., (2020), quienes en su estudio identifican estos flavonoides en mieles nacionales de diverso origen floral y geográfico. Estos mismos compuestos han sido detectados en el perfil fenólico de *Cryptocarya alba* (peumo chileno), árbol endémico que se encuentra distribuido desde la región de Coquimbo a la región de los Ríos (Simirgiotis, 2013), cuyo aporte de néctar podría ser importante para la fabricación de estas mieles. Una particular predominancia de quercetina y crisina se observó en las muestras analizadas; las que se consideran buenos marcadores de calidad para la miel chilena (Bridi et al., 2019). Por otra parte, se observó la presencia de apigenina principalmente en muestras de la VI y VII regiones, mientras que kaempferol estuvo presente preferentemente en las muestras provenientes de las regiones IV, V y RM. Además, el contenido de crisina fue mayor en las muestras de VII a X regiones. La presencia de estos flavonoides de manera específica en mieles de ciertas regiones está ligada a la flora que emplean las abejas en su preparación. Esto los haría candidatos a marcadores para diferenciar las mieles provenientes de dichas regiones.

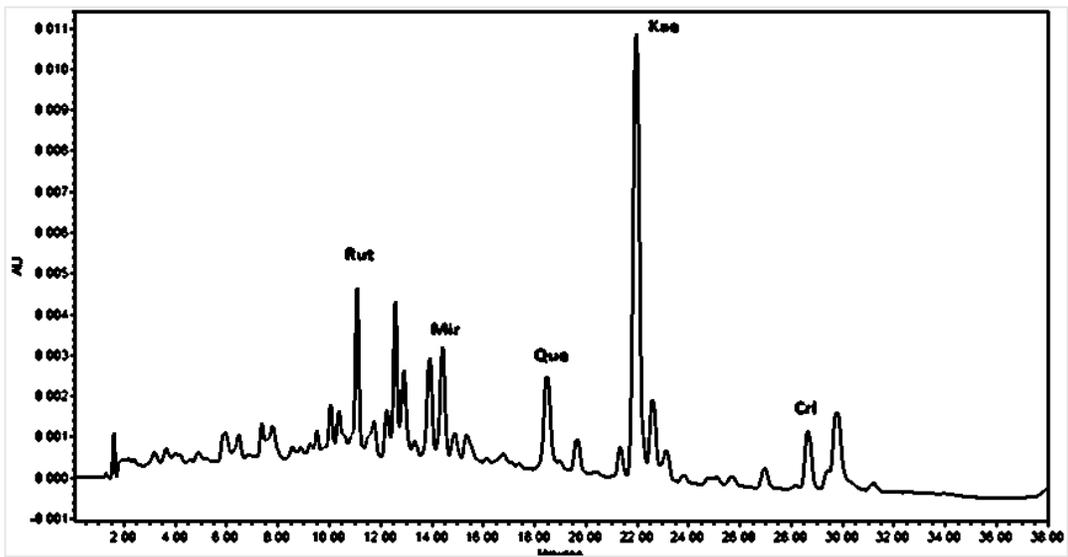


Figura 14. Cromatograma HPLC-DAD de la miel M9-RM registrado a 360 nm. Se observa la presencia de cinco flavonoides del interés de este estudio.

Tabla 6. Contenido de flavonoides totales (ugQue/g de miel) y específicos identificados (ug/g de miel) en las mieles estudiadas.

Miel	Flavonoides totales	Rut.	Mir.	Que.	Api	Kae.	Cri.
M1-IV	5,1 ± 0,7	-----	-----	1,1 ± 0,1	-----	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1
M2-IV	5,8 ± 0,4	-----	-----	0,5 ± 0,1	-----	1,4 ± 0,2	1,1 ± 0,1
M3-V	2,5 ± 0,3	-----	-----	0,5 ± 0,1	-----	1,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2
M4-V	1,9 ± 0,3	-----	-----	-----	-----	-----	0,9 ± 0,1
M5-V	1,1 ± 0,1	-----	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	-----	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1
M6-V	6,6 ± 1,6	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1	2,7 ± 0,3	-----	0,5 ± 0,1	-----
M7-V	0,7 ± 0,3	-----	-----	0,5 ± 0,1	-----	0,2 ± 0,1	-----
M8-RM	1,1 ± 0,1	-----	-----	0,8 ± 0,1	-----	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1
M9-RM	4,5 ± 0,6	1,3 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	-----	2,8 ± 0,1	1,5 ± 0,1
M10-RM	1,1 ± 0,2	0,6 ± 0,1	-----	1,5 ± 0,1	-----	0,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1
M11-RM	8,6 ± 0,2	-----	-----	1,2 ± 0,1	-----	-----	-----
M12-RM	0,9 ± 0,1	-----	-----	0,1 ± 0,1	-----	-----	-----
M13-VI	1,1 ± 0,2	-----	-----	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1
M14-VI	0,0 ± 0,1	-----	-----	0,8 ± 0,1	-----	-----	-----
M15-VI	2,6 ± 0,1	-----	-----	0,9 ± 0,1	-----	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,1
M16-VI	1,2 ± 0,1	-----	-----	0,9 ± 0,1	0,2 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,0 ± 0,1
M17-VII	1,2 ± 0,5	-----	-----	0,7 ± 0,1	0,4 ± 0,1	-----	2,3 ± 0,3
M18-VII	1,2 ± 0,1	-----	-----	-----	0,4 ± 0,1	-----	3,8 ± 0,2
M19-VII	0,3 ± 0,1	-----	-----	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,9 ± 0,1	2,6 ± 0,1
M20-VII	2,2 ± 0,2	-----	-----	0,8 ± 0,1	0,3 ± 0,1	-----	1,0 ± 0,1
M21-VII	1,4 ± 0,3	-----	-----	1,5 ± 0,1	-----	-----	2,0 ± 0,1
M22-IX	1,6 ± 0,1	-----	-----	1,5 ± 0,1	-----	-----	1,4 ± 0,1
M23-X	1,8 ± 0,5	-----	-----	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,1	-----	2,2 ± 0,1
M24-X	1,9 ± 0,2	-----	-----	-----	-----	-----	2,2 ± 0,1
M25-X	4,5 ± 0,1	-----	-----	1,3 ± 0,1	-----	-----	0,7 ± 0,1
M26-X	1,8 ± 0,1	-----	-----	-----	-----	-----	1,6 ± 0,2
LOQ		0,019	0,003	0,004	0,001	0,001	0,003

Finalmente, en la tabla 5 se presentan las concentraciones de ácidos fenólicos y flavonoides de mieles de diversos orígenes geográficos, con el objetivo de comparar estos valores con los obtenidos en el presente estudio. En general se observan valores similares de ácidos fenólicos y flavonoides entre las mieles nacionales y aquellas provenientes de diferentes partes del mundo, considerando además que se aplicaron diferentes métodos de extracción de estos compuestos.

Tabla 7. Contenido de polifenoles (ácidos fenólicos y flavonoides) en mieles del mundo.

Origen miel	Contenido ácidos fenólicos (ug/g de miel)	Contenido flavonoides (ug/g de miel)	Método de extracción	Método de análisis	Referencia
Italia	0,03-0,59	0,02-0,64	DLLME	HPLC-UV	Campone et al., (2014)
Polonia	0,06- 9,1	0,04-0,78	LLE	HPLC-UV	Socha et al. (2011)
Azerbaiyán	0,57- 2,67	0- 0,64	LLE	HPLC-Uv-vis	Degirmenci et al., (2020)
China	1,7-66	0,2-1,9	LLE	HPLC-DAD	Cheung et al., (2019)
China	0,4-0,7	0,8- 1,1	SULLE	HPLC-ECD	Zhu et al., (2019)
Australia y Nueva Zelandia	0,4-45	0,4-11	SPE	HPLC-UV	Yao et al., (2003)
Chile	0,1- 48	0,09- 4,9	SULLE	HPLC-DAD	Este estudio

6.2 Determinar la concentración de H₂O₂ y del radical hidroxilo en función de la función del tiempo de incubación en muestras de miel de la zona central de Chile.

6.2.1 Determinación de la concentración de H₂O₂

La formación del peróxido de hidrógeno en la miel se da por la oxidación de la glucosa en condiciones aeróbicas obteniendo como productos de la reacción ácido glucónico y peróxido de hidrogeno. Esta reacción es catalizada por la enzima glucosa-oxidasa, que aporta la abeja cuando deposita el néctar en la colmena para su maduración. (Bucekova et al., 2018). Sin embargo, como se ha mencionado previamente, existiría una vía alternativa no enzimática de formación de peróxido de hidrógeno en la que estarían involucrados los polifenoles (flavonoides y ácidos fenólicos).

En primer término, se evaluó la formación de peróxido de hidrógeno de las mieles disueltas en agua y en buffer fosfato a pH 6.5 luego de 3 horas de acumulación. El resultado obtenido se presenta en la tabla 8. Podemos observar que en términos generales la generación de peróxido de hidrógeno fue menor en el caso de las muestras preparadas en agua ultrapura. Esto se debe principalmente a que la reacción de formación del H₂O₂ se ve favorecida a mayor pH del medio tamponado que en el medio ácido de la miel disuelta en agua (aproximadamente 4) (Higuera Cobos & Trisancho Reyes, 2006).

Tabla 8. Formación de peróxido de hidrógeno en miel diluida en agua ultrapura y en buffer fosfato pH 6.5 (expresado en μg por gramo de miel).

<i>Miel</i>	<i>3 horas. Miel preparada en buffer fosfato pH 6.5</i>	<i>3 horas. Miel preparada en H₂O ultrapura</i>
M1-IV	36 ± 4	27,7 ± 1,8
M2-IV	10,4 ± 0,3	6,5 ± 1,2
M3-V	24,9 ± 0,9	14,4 ± 1,4
M4-V	9,2 ± 0,5	13,4 ± 0,3
M5-V	14,2 ± 1,2	10,9 ± 0,1
M6-V	26,5 ± 0,1	12,0 ± 0,2
M7-V	17,7 ± 0,7	10,3 ± 1,1
M8-RM	22,5 ± 0,9	9,3 ± 0,6
M9-RM	27,3 ± 2,4	34,5 ± 1,0
M10-RM	19,9 ± 0,1	24,3 ± 2,6
M11-RM	11,4 ± 0,3	9,7 ± 0,5
M12-RM	2,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1
M13-VI	14,0 ± 0,6	19,0 ± 1,1
M14-VI	18,2 ± 0,5	8,5 ± 0,7
M15-VI	10,2 ± 0,6	8,7 ± 0,4
M16-VI	8,4 ± 0,2	8,3 ± 0,3
M17-VII	18,3 ± 0,2	23,9 ± 1,2
M18-VII	35,7 ± 0,4	32,7 ± 0,9
M19-VII	34,8 ± 0,4	24,6 ± 0,8
M20-VII	25,0 ± 1,1	23,3 ± 0,9
M21-VII	9,4 ± 0,1	7,5 ± 0,3
M22-IX	8,1 ± 0,1	2,5 ± 0,8
M23-X	22,8 ± 1,9	29,4 ± 1,7
M24-X	11,4 ± 2,9	9,5 ± 0,4
M25-X	5,7 ± 0,1	3,0 ± 0,1
M26-X	57,9 ± 4,9	16,4 ± 0,5

Posteriormente se evaluó la formación de H_2O_2 a distintos tiempos de incubación (0; 3 y 24 horas). Los resultados obtenidos se presentan en la figura 15. En general se observa que a las 3 horas las mieles alcanzan su máxima acumulación de peróxido de hidrógeno; con valores comprendidos entre $1,8 \pm 0,2$ y 58 ± 5 μg de H_2O_2 / gramos de miel. Transcurrido este tiempo la acumulación tiende a mantenerse y en algunos casos a aumentar, registrándose el valor máximo de $69 \mu g$ de H_2O_2 / gramo de miel, a las 24 horas, para la miel M3-V. Las excepciones fueron las mieles M1-IV y M26-X, donde se percibe una notoria disminución luego de 24 horas de incubación. El incremento promedio en la generación de peróxido de hidrógeno fue de un 40% entre las 0 y 3 horas y de un 20% a las 3 y 24 horas.

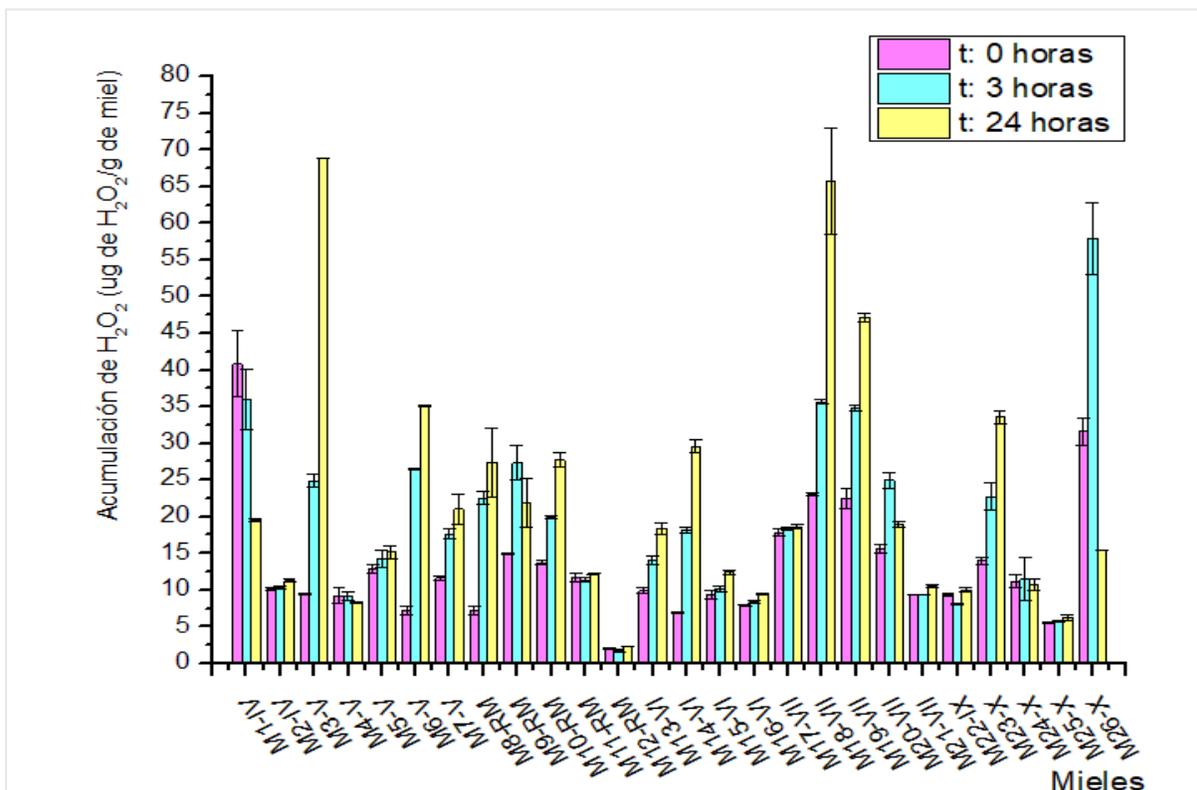


Figura 15. Acumulación de peróxido de hidrógeno ($\mu g/g$ de miel) al tiempo inicial, 3 y 24 horas en las mieles analizadas.

Se observó además un comportamiento diferenciado en tres grupos de mieles para la acumulación de peróxido de hidrógeno en el tiempo (figura 16). Estos fueron un incremento sostenido, disminución o mantención luego de 24 horas de incubación. La composición de estos grupos fue heterogénea con mieles de distinto origen en cada caso. Por otra parte, en un análisis mediante PCA no se observó ninguna relación entre este agrupamiento y alguna característica en particular de las mieles.

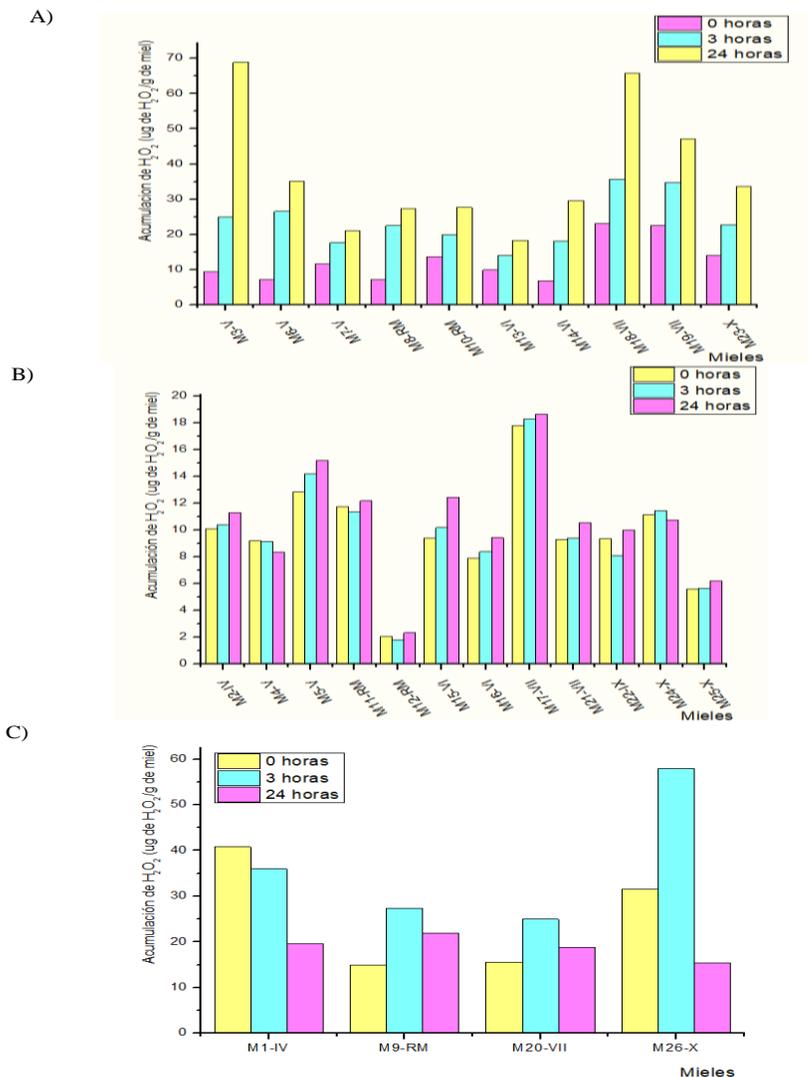


Figura 16. Gráficos comparativos que indican en a) aumento de H_2O_2 en el tiempo, b) mantiene y c) disminuye de la acumulación contenido de H_2O_2 en el tiempo.

A modo de comparación, en la tabla 9 se presenta la concentración de H_2O_2 en mieles provenientes de distintos lugares del mundo. Se incluyen los valores obtenidos en el estudio realizado por Cebrero et al., (2020), de nuestro grupo de trabajo, en mieles de la VI región de nuestro país, así como los valores del presente estudio. Si bien las condiciones empleadas para la generación de H_2O_2 son variadas en términos de dilución de la miel, medio empleado para diluirla, tiempo y temperatura de incubación; los valores del presente estudio son similares a los reportados en mieles con un origen geográfico variado y en mieles nacionales recolectadas en temporadas anteriores. Yupanqui Mieles et al., (2022), señalan que el peróxido de hidrogeno tiene dos maneras de actuar frente un microorganismo, en los cuales ambos dependen de la concentración de este. El primero es por medio de la reacción de Fenton; donde el H_2O_2 que se formó en presencia de los iones metálicos, generan radicales hidroxilos y otras especies oxigenadas, que actúan como agentes oxidantes, ocasionando modificaciones a las bases nitrogenadas y azúcares que constituyen el ADN bacteriano. La segunda manera se relaciona con la sensibilidad a la exposición del H_2O_2 , mientras mayor sea el tiempo de exposición, mayor será el daño producido y por consiguiente la inhibición en el crecimiento bacteriano. Deterioro que se evidenció en el aumento de la concentración de carbonilos, señal de oxidación de las proteínas que constituyen al organismo afectado (Brudzynski et al., 2011), establecieron que la concentración mínima en que actúa el peróxido de hidrogeno para causar degradación del ADN es de 2,5 mM, mientras que en la miel este efecto se observa para concentraciones en el intervalo 0,5 a 2 mM de. Esta mayor eficiencia sería debido al efecto citotóxico de la generación del $\bullet OH$ a partir del H_2O_2 , actuando además de forma sinérgica con otros componentes menores de la miel. Estos valores de concentración son similares a los encontrados en las mieles evaluadas en el presente estudio (0,06 y 1 mM para una dilución al 20%).

Tabla 9. Concentración de H₂O₂ en mieles provenientes de distintos lugares del mundo.

Origen miel	H ₂ O ₂ ug/g	Condiciones para generación	Referencia
Eslovaquia	1-20	40%p/v en agua, 4 hrs de incubación a 37°C	Bucekova y col., (2014)
China	0,2-7,2	Sin información sobre dilución 30 min de incubación	Li y col., (2017)
Eslovaquia	2,4-47	40% p/v buffer pH 7, sin incubación	Bucekova y col., (2019)
Australia	0,9-50	30%p/v en agua, 4 hrs de incubación a temperatura ambiente	Sindi y col., (2019)
Polonia	1-51	25%p/v en agua, 1 hr de incubación a 37° C	Grecka y col., (2018)
Eslovaquia	2-54	40% p/v buffer pH 7, sin incubación	Farkasovska y col., (2019)
Córcega	4-9	40%p/v en agua, 30 min de incubación a temperatura ambiente	Poli y col., (2018)
Portugal	1-6	40%p/v en agua (sin más información)	Freitas y col., (2021)
Australia	5-50	30% p/v en agua, 2 h incubación temperatura ambiente	Roshan y col., (2017)
Suiza	17-68	40% p/v buffer pH 7, sin incubación	Godocikova y col., (2020)
Canadá	5-40	16%p/v en buffer pH 7, 2 hrs de incubación a temperatura ambiente	Brudzynsky (2006)
Japón	3-15	10%p/v en buffer pH 7, 30 minutos de incubación a 37° C	Karasawa y col., (2020)
Chile (VI región)	0,6-49	20%p/v en buffer pH 6,5; 3 hrs de incubación a temperatura ambiente	Cebrero y col., (2020)
Chile (diversas regiones)	1,8-58	20%p/v en buffer pH 6,5; 3 hrs de incubación a temperatura ambiente	Este estudio

Con el objetivo de visualizar la producción de peróxido de hidrógeno asociada a la presencia de componentes menores (especialmente polifenoles); se inhibió la acción de la enzima GOX al adicionar una proteasa al medio de incubación (proteínasa K). La Figura 17 resume los resultados obtenidos. En la mayoría de las muestras se observó una disminución significativa en la generación de peróxido de hidrógeno al inhibir la acción de GOX. Sin embargo, esta disminución fue en promedio sólo de un 15% (sólo las muestras M1-IV y M3-V presentaron disminuciones mayores con un 45 y 35 %, respectivamente); mientras que en otras no hubo un cambio significativo. Esto indica que el mayor porcentaje del peróxido de hidrógeno generado (sobre el 80% en general) se debería a reacciones químicas que involucran a componentes menores, donde los polifenoles tendrían un rol relevante, antes que a la generación mediada por la GOX.

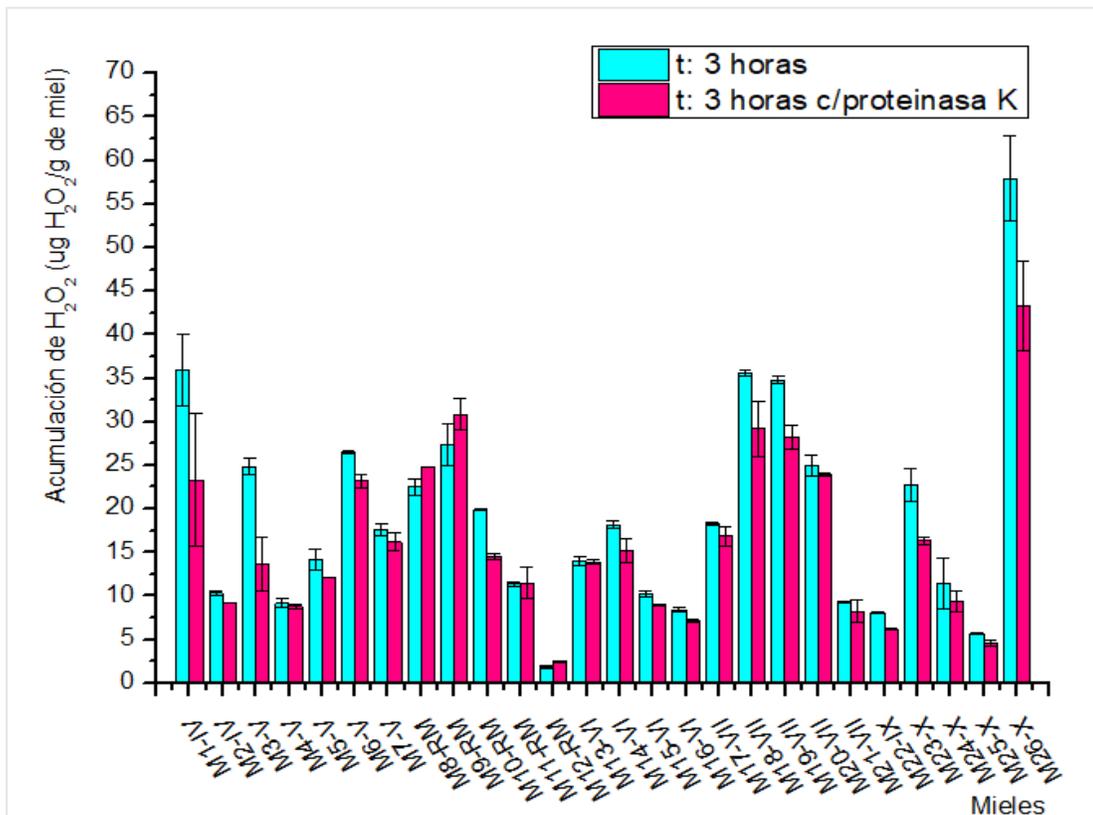


Figura 17. Comparación de la acumulación de H₂O₂ (ug/g de miel) a las 3 horas, con y sin inhibición de la GOX en las mieles analizadas

6.2.2 Determinación de la concentración de radical OH •

Si bien se ha establecido que la generación de peróxido de hidrógeno en la miel está implicada en la inhibición del crecimiento bacteriano; donde su eficacia inhibidora sería modulada por otros componentes de la miel; se presume que es la formación de •OH a partir de H₂O₂, la que puede estar directamente implicada en la inhibición del crecimiento bacteriano (Brudzynski et al., 2011, 2012; Brudzynski & Lannigan, 2012). Es decir que el efecto antibacteriano de las mieles se asocia a la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS), incluyendo H₂O₂, el radical superóxido (O₂•) y radicales hidroxilos (HO•), que causan daños oxidativos en las membranas celulares de las bacterias (Karasawa et al., 2020). En consecuencia, se efectuó la determinación del radical hidroxilo mediante la técnica de resonancia electrónica de espín (REE). Esta técnica permite detectar este radical, cuya vida media es de muy corta duración (10⁻⁹ segundos aproximadamente), gracias al empleo de una molécula diamagnética (un atrapador) que reacciona con aquel conformando una especie paramagnética más estable. Los análisis de miel se hicieron utilizando como atrapador el 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO); que al reaccionar forma el aducto DMPO-OH. En la figura 17a se muestra el espectro REE, característico de este aducto con cuatro líneas con una intensidad proporcional de 1:2:2:1. Para obtener los espectros REE de las mieles, estas fueron disueltas en agua ultrapura, por tanto, el solvente no aporta señal al espectro. Para asegurar la generación máxima y completa del radical hidroxilo, las muestras se incubaron durante 10 minutos a 60°C. En la figura 17b se muestra el espectro de la miel M20-VII donde se distingue la formación del spin-aducto de DMPO-OH y señales de menor intensidad, que muestran una estructura hiperfina multicomponente que se genera a partir de radicales centrados en carbono. La presencia del radical OH• se corroboró a través del valor de las constantes de acoplamiento hiperfinas, que fueron G14,8 y G15,1.

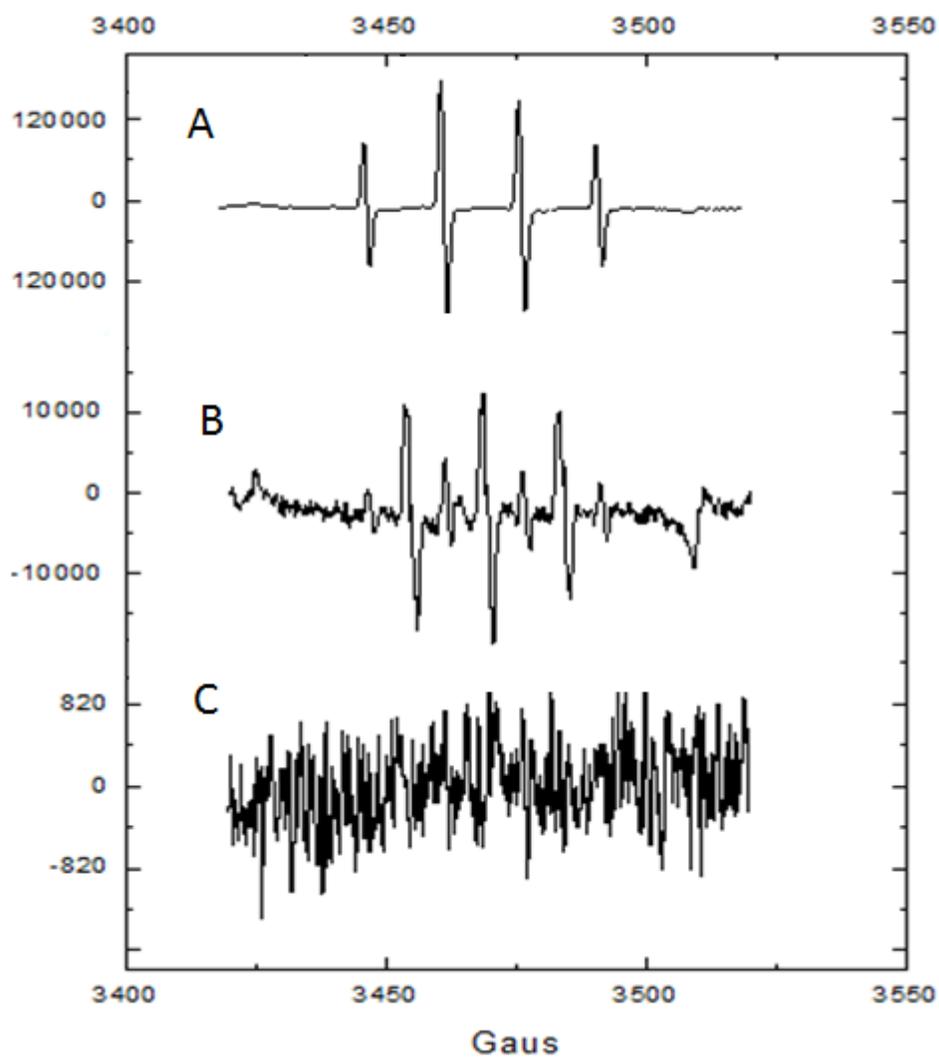


Figura 18. Espectros REE de (A) Aducto formado por el DMPO-OH, (B) la miel M20-VII y (C) señal control negativo, en donde hay ausencia del espín-aducto DMPO-OH

El grado de generación del radical hidroxilo en las mieles fue establecido de manera relativa; asignándole un valor de 10 a la miel con mayor generación (M17-VII), al mantener las mismas condiciones experimentales, podemos realizar una comparación entre muestras. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 19.

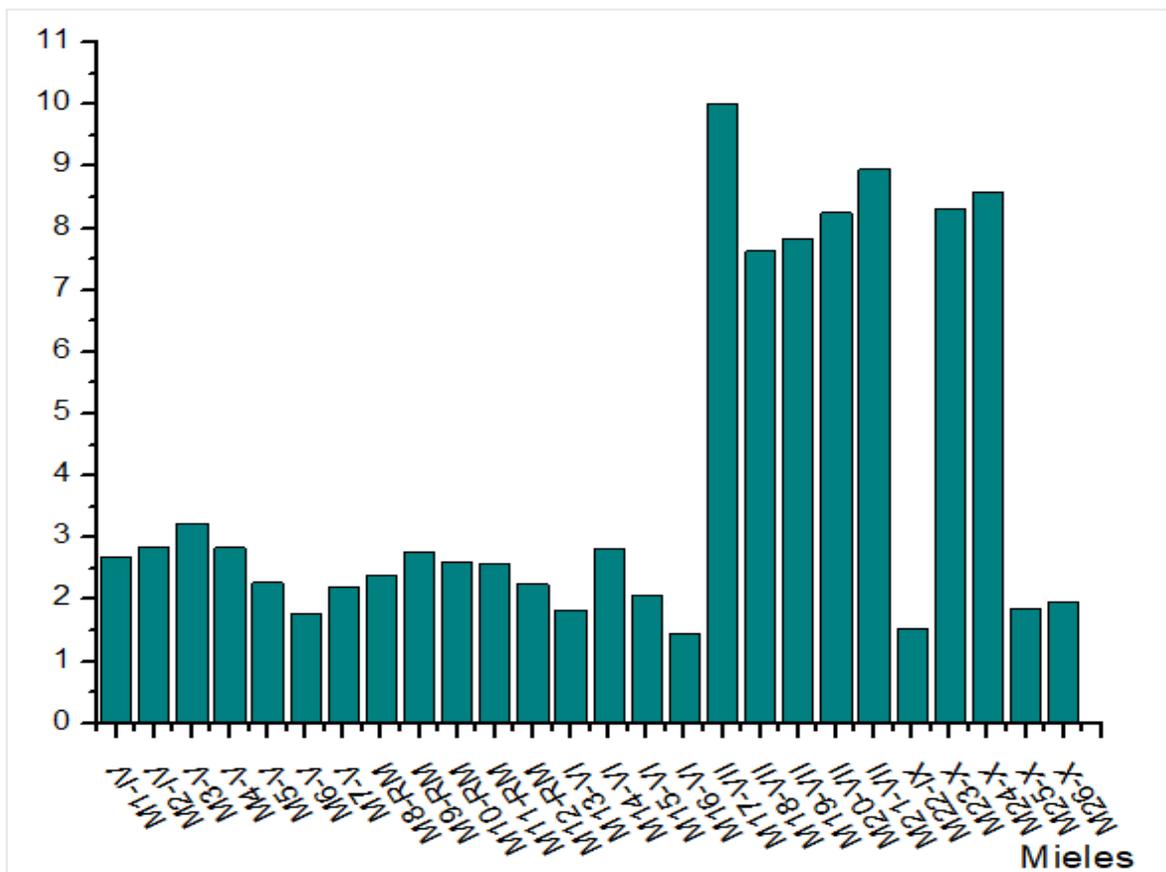


Figura 19. Formación de radical hidroxilo en las mieles expresado en cantidad relativa respecto a la miel con mayor generación (M17-VII).

Tal como se observa en la figura 19, las mieles de la VII región y las mieles M23 y M24 de la X región generaron una cantidad de radical $\text{OH}\cdot$ entre 4 y 5 veces mayor que las restantes mieles del centro norte y sur. Cabe destacar que se observó una coincidencia entre los mayores valores de radical $\text{OH}\cdot$ y los mayores contenidos de crisina para las muestras mencionadas; lo cual evidenciaría la acción “prooxidante” de esta flavona cuyo efecto es la generación ROS en la miel. Por otra parte, los espectros REE de varias mieles mostraron la presencia de radicales centrados en carbono; lo que se asocia a la capacidad de estas mieles de atrapar radicales OH y por lo tanto de presentar igualmente actividad antioxidante, por medio de la generación de radicales centrados en carbono (Henatsch et al., 2018). Las mieles presentan entonces una dualidad antioxidante/prooxidante, manifestándose la acción prooxidante, cuando los compuestos fitofenólicos se encuentran en presencia de cationes de metales de transición tal como el Fe, Cu y Mn; generando complejos que favorecen la formación de ROS como el radical hidroxilo el que produce la rotura de la cadena de ADN de los microorganismos (Sakihama,

2002; Yupanqui Mieles et al., 2022). Este radical hidroxilo es generado por reacciones Fenton o tipo Fenton, en la que intervienen elementos con estados de oxidación intermedios, tal como es el caso de los metales mencionado (Bokare & Choi, 2014;

6.3 Determinar el contenido de cobre, hierro, manganeso y cinc en muestras de miel de la zona central de Chile.

En la composición de la miel los metales se encuentran al nivel de traza y comprenden en promedio el 0,2% en peso de esta (Belitz et al., 2009). La diversidad y cantidad de los metales en la miel reflejan su presencia en plantas desde donde la abeja recolecta el néctar, el agua que consumen y el proceso de almacenaje de la miel (Hungerford et al., 2020; Silveira-Júnior et al., 2020). Algunos de estos metales podrían modular la acción prooxidante de la miel y jugar un papel relevante en su actividad antibacteriana, entre ellos hierro, manganeso, cobre y cinc. Por ello se determinaron sus concentraciones en las muestras estudiadas.

En la tabla 10 podemos observar el contenido de estos cuatro metales en las mieles provenientes de la zona central de Chile. Las concentraciones fluctúan entre 1-17; 1-11; 0,1-13 y 0,6-11 y mg/kg de miel para Fe, Cu, Zn y Mn; respetivamente. Estos valores se asemejan a los reportados por Fredes & Montenegro, (2006), quienes estudiaron mieles chilenas recolectadas entre 2001 y 2003 con valores promedio de Zn: 0.08 ± 0.30 , Fe: 1.45 ± 1.36 , Mn: 0.53 ± 0.63 y Cu: 0.66 ± 1.01 mg/kg miel. El orden decreciente de abundancia en la muestra fue Fe > Cu > Zn > Mn. Hierro y zinc son esenciales para el crecimiento de plantas, por esta razón, es común que en la práctica agrícola sean aplicados fertilizantes que en su formulación contengan estos elementos, y así encontrarse en el néctar de estas plantas y consecuentemente en la miel (Hungerford et al., 2020).

Tabla 10. Contenido de hierro, cobre, zinc y manganeso (mg/kg de miel) en las mieles estudiadas.

Miel	Mn	Zn	Fe	Cu
M1-IV	2,0 ±0,2	1,9 ± 0,2	7,5 ±0,2	5,8 ± 0,2
M2-IV	1,7 ±0,2	2,7 ± 0,2	3,4 ±0,2	3,9 ± 0,2
M3-V	1,0 ±0,2	6,9± 0,2	5,1±0,2	5,5 ± 0,2
M4-V	2,8 ±0,2	8,1± 0,2	7,0±0,2	9,6± 0,2
M5-V	3,0 ±0,2	12,6±0,2	7,2±0,2	7,4± 0,2
M6-V	5,6 ±0,2	3,4± 0,2	16,9±0,2	2,5± 0,2
M7-V	3,8±0,2	5,8± 0,2	8,1±0,2	3,4± 0,2
M8-RM	3,5±0,2	0,9± 0,2	1,4±0,2	5,5± 0,2
M9-RM	1,1±0,2	1,2± 0,2	5,8±0,2	1,3± 0,2
M10-RM	0,9±0,2	1,4± 0,2	4,5±0,2	1,5± 0,2
M11-RM	1,1±0,2	2,9± 0,2	4,3±0,2	7,6± 0,2
M12-RM	0,0±0,2	0,1± 0,2	1,8±0,2	1,1± 0,2
M13-VI	2,4±0,2	2,8± 0,2	4,3±0,2	3,4± 0,2
M14-VI	0,6± 0,2	3,3± 0,2	4,6±0,2	10,8± 0,2
M15-VI	1,4±0,2	2,9± 0,2	7,8±0,2	3,0± 0,2
M16-VI	1,4±0,2	2,6± 0,2	5,8±0,2	6,6± 0,2
M17-VII	6,5±0,2	2,8± 0,2	14,7±0,2	2,7± 0,2
M18-VII	1,7±0,2	2,2± 0,2	8,4±0,2	1,1± 0,2
M19-VII	1,0±0,2	3,3± 0,2	9,1±0,2	0,9± 0,2
M20-VII	9,8±0,2	4,0± 0,2	8,3±0,2	4,4± 0,2
M21-VII	3,2±0,2	2,0± 0,2	3,5±0,2	3,1± 0,2
M22-IX	11,4±0,2	2,5± 0,2	5,5±0,2	3,0± 0,2
M23-X	4,1±0,2	2,1± 0,2	5,6±0,2	2,2± 0,2
M24-X	5,1±0,2	0,5± 0,2	14,1±0,2	2,8± 0,2
M25-X	1,3±0,2	3,3± 0,2	4,5±0,2	2,5± 0,2
M26-X	1,4±0,2	0,8± 0,2	4,3±0,2	3,1± 0,2
Promedio	6 ± 3	4 ± 2	3 ± 2	2 ± 2

En la figura 20 se presenta el contenido de los metales en las mieles según su origen geográfico. El contenido de hierro en las mieles (figura 20A) es más bien homogéneo en relación con su origen geográfico. Un ejemplo de ello es que las mieles de diversas regiones (M6-V; M17-VII y M24-X) presentaron los mayores contenidos de este elemento. En cuanto al cobre, las mieles del centro y centro-norte del país (IV a VI regiones) presentaron un mayor contenido de este elemento respecto a las del centro-sur (figura 20B) y se relacionan con el contenido de cinc. El mayor contenido de cobre en estas muestras se explica por la reconocida presencia de cobre desde la VI región de O' Higgins hacia el norte de nuestro país, donde se desarrollan actividades mineras ligadas a su extracción y se encuentran aproximadamente el 40% de las reservas de este mineral en el planeta (Servicio Nacional de Geología y Minería (Chile), 2021) . La concentración de zinc (figura 20C) fue mayor en las mieles provenientes de la IV y V regiones, siendo la miel M5-V la que presentó el mayor valor (13 mg/kg). Finalmente, y contrario al cinc, la concentración de manganeso fue mayor en mieles provenientes del centro- sur del país (figura 20D).

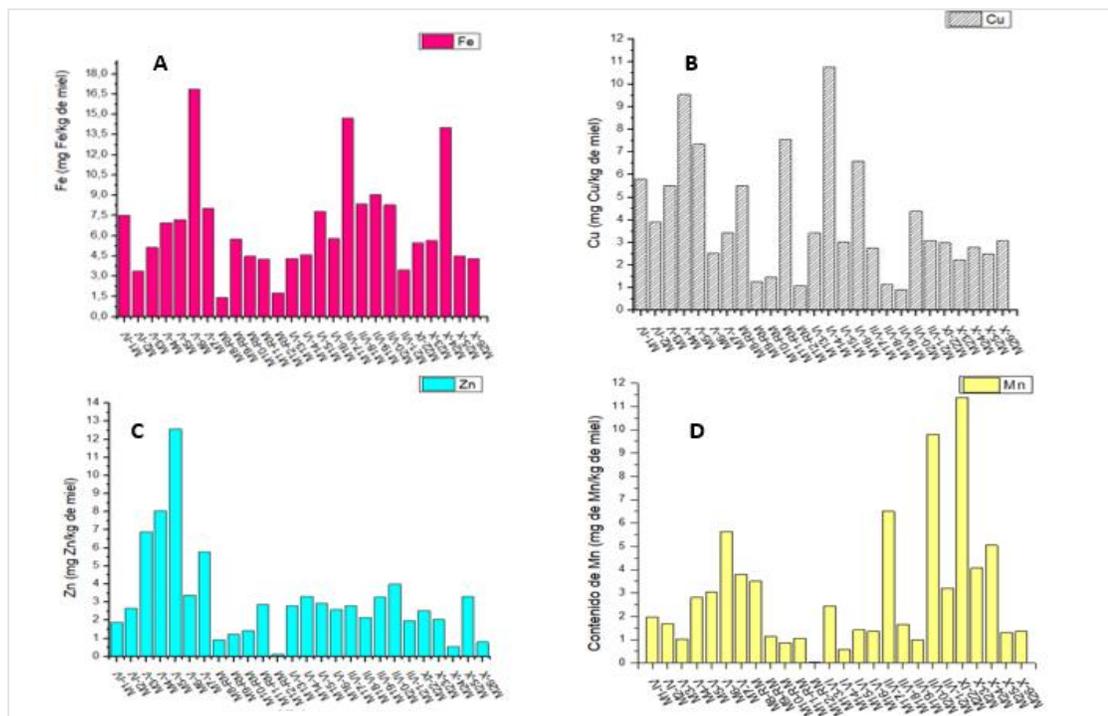


Figura 20. Conetido de hierro (A), cobre (B), cinc (C) y manganeso (D) (mg/kg de miel) en las mieles analizadas.

6.4 Evaluar la actividad antibacteriana de muestras de miel de la zona central de Chile contra *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomona aeruginosa*.

Nuevos estudios han redescubierto el uso de la miel como alternativa terapéutica y su gran potencial como opción a la creciente resistencia que muestran los microorganismos a los tratamientos convencionales, transformándose en un tema de relevancia para las políticas de salud pública (Kwakman et al., 2011; Tsavea & Mossialos, 2019). La actividad antibacteriana de la miel está asociada a su alta osmolaridad, bajo pH, acumulación de peróxido de hidrógeno, la presencia del péptido antimicrobiano defensina-1 y el compuesto MGO (presente en las mieles de Manuka). Siendo el principal responsable, el peróxido de hidrógeno que, al interactuar con otros componentes menores de la miel, producen daño oxidativo en las bacterias (Brudzynski et al., 2011; Bucekova et al., 2018).

En estudios recientes se ha reexaminado la acción que tienen los componentes menores, tal como los polifenoles y minerales, y como estos contribuyen de igual manera a la generación de H₂O₂. Son estas características y componentes que promueven una actividad de amplio espectro de acción contra bacterias patógenas (Kwakman et al., 2011).

En este trabajo, se evaluó la concentración mínima inhibitoria (MIC) a 15 de las 26 mieles analizadas (las cuales fueron escogidas de acuerdo con la variabilidad del origen geográfico), considerando la muerte del 99% de la población bacteriana de *S. epidermidis* y *P. aeuroginosa*. Como se puede observar en el gráfico de la figura 21, para las pruebas contra *S. epidermidis* las mieles mostraron un MIC que osciló entre 3,12% y 50% v/v, en el caso de *P. aeuroginosa* está varió entre 12,5% v/v y 50% v/v. Podemos observar, que *S. epidermidis* fue más sensible a la acción antibacteriana de la miel que *P. aeuroginosa*. Esta diferencia podría estar relacionada con las características morfológicas y estructura de la pared celular de estas especies de bacterias. Tal como se presenta en la figura 22; *S. epidermidis* posee membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano (Grampositiva); mientras que *P. aeuroginosa* presenta dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano (Gramnegativa). Se ha descrito que la membrana externa de las bacterias Gramnegativa las protege de antibióticos, colorantes y detergentes que normalmente dañarían la membrana interna o la pared celular de peptidoglicano.

La membrana externa proporciona a estas bacterias resistencia a la lisozima y a la penicilina y podría hacerlas igualmente más resistente

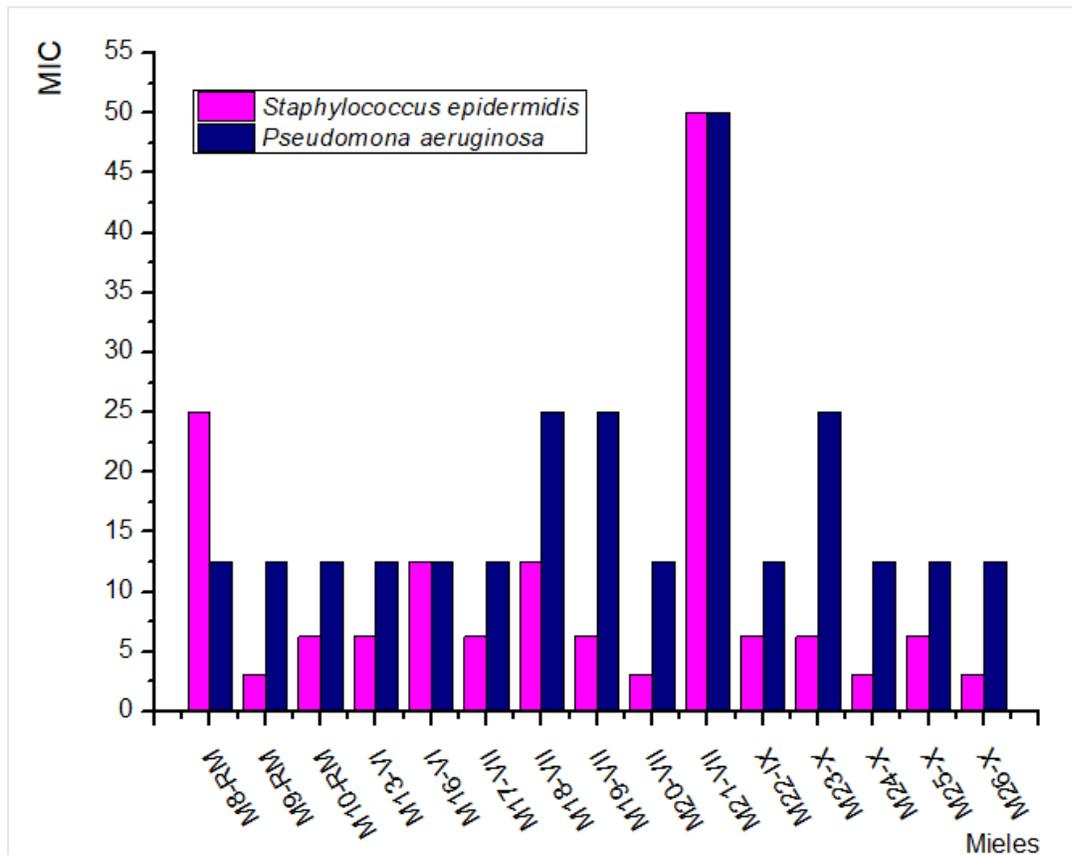


Figura 21. Actividad antibacteriana de las mieles estudiadas contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* evaluada como concentración inhibitoria mínima (MIC)

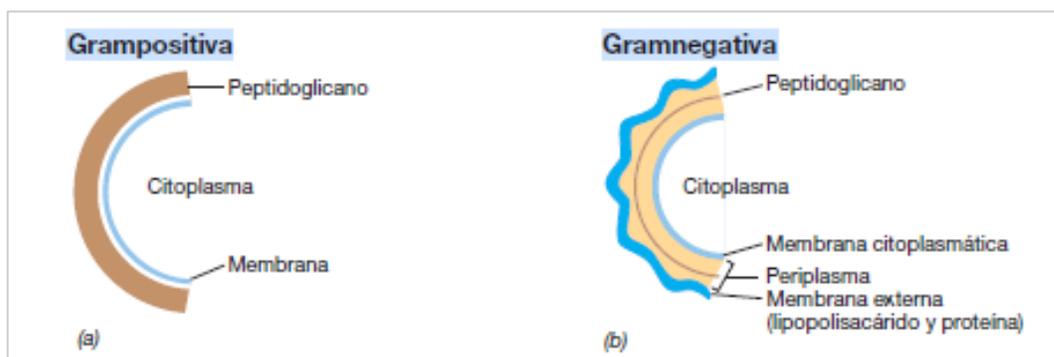


Figura 22.(a, b) Diagramas esquemáticos de paredes celulares grampositivas y gramnegativas. (Madigan et al., 2009).

Otra evidencia que podemos considerar respecto a la resistencia que presenta *P.aeruginosa*, es que este tipo de bacterias posee dos tipos de factores de patogenicidad: Factores de patogenicidad asociados a la célula bacteriana y factores de patogenicidad secretados. El primero está asociado a la morfología de la bacteria, que posee flagelo, permitiéndole movilizarse por el organismo hospedero, liberando las proteínas flagelares FLiD, FLiC a su paso y que desencadenan la secreción de péptidos antimicrobianos por parte del sistema inmune del hospedero. En cuanto a la segunda causa, la bacteria libera alginato, como parte del mecanismo de supervivencia, en conjunto a la secreción de toxinas asociados a esta especie bacteriana y la liberación del pigmento piocianina, de color azul verdoso característico de la virulencia, metabolito que tiene la característica de tener un efecto protector contra los ROS y las especies nitrogenadas secretadas por el sistema inmune (Paz-Zarza et al., 2019).

Las mieles M9-RM; M20-VII; M24-X y M26-X fueron las que tuvieron una mayor actividad antibacteriana contra las *S. epidermidis*, siendo de diverso origen geográfico y botánico, pero que en la identificación de compuestos fenólicos todas tienen en su composición crisina, compuesto ampliamente descrito por sus propiedades anticancerígenas, neuro protectoras y antimicrobiales (Mani & Natesan, 2018; Sharma et al., 2021), el que tiene la facultad de inhibir la replicación infecciosa, interfiriendo en la actividad de las proteasas liberadas por el microorganismo (Wang et al., 2014).

6.5 Establecer la existencia de correlaciones entre los compuestos químicos de la miel y su actividad antibacteriana mediante análisis multivariado.

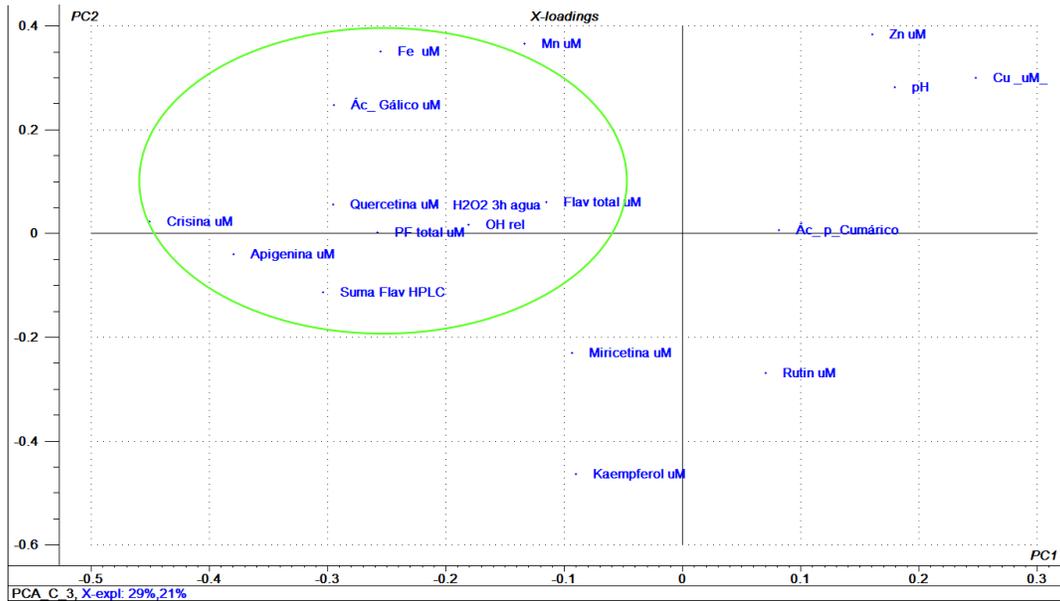
Las herramientas quimiométricas son de gran utilidad para procesar una gran cantidad de información, ayudando a esclarecer relaciones multifactoriales y establecer modelos predictivos entre los parámetros estudiados. En esta investigación se emplearon el análisis de componentes principales (PCA) y la regresión sobre mínimos cuadrados parciales (PLS) para determinar las relaciones entre los distintos componentes de la miel, la generación de ROS y su acción inhibitoria sobre dos tipos de bacterias.

En primer lugar, se realizó el PCA de la data disponible. Este permite agrupar las muestras y variables en base a ciertas características comunes que las relacionan (agrupamiento

no supervisado). Para ello, se establece un nuevo conjunto de componentes ortogonales entre sí (nuevo espacio vectorial) a los que se les denomina componentes principales, generados a partir de la combinación lineal de las variables originales. Estos componentes recogen la variabilidad de la información original de manera decreciente, donde los primeros componentes acumulan la mayor información significativa de los datos originales (G. Zhang & Abdulla, 2022; J. Zhang et al., 2020). Para realizar el PCA los datos originales fueron ordenados en una matriz X, de tamaño N*M, donde N corresponde las 26 mieles estudiadas y M los parámetros evaluados en estas. Entre los parámetros asociados a la generación de H₂O₂, solamente se incluyó el medido a las 3 horas de incubación en agua; ya que fue el más representativo. Por otra parte, las concentraciones en ug/g de los componentes de la miel fueron convertidos a uM, considerando una solución al 20% p/v, de manera que se pudiesen establecer relaciones molares entre las variables.

La figura 23 corresponde al gráfico de las variables para los tres primeros componentes presentados en ejes cartesianos (“loading plot”), el que permite visualizar las relaciones entre estas. Estos tres primeros componentes representan el 29, 19 y 15% de la información respectivamente. Se observa un grupo de variables formada por la acumulación de peróxido de hidrogeno en medio acuoso a las 3 horas, radical hidroxilo, la suma de los flavonoides identificados por HPLC, crisina, apigenina, polifenoles totales, quercetina y Fe; los que en primera instancia están relacionados. Este hecho se corroboró analizando las correlaciones individuales y sus significancias ($p < 0,05$), cuyo resultado se resume en la tabla 11. Se observa que la sumatoria de los flavonoides identificados por HPLC es la que presenta el valor de r más alto en su correlación con la producción del H₂O₂ ($p = 0,0004$) (Figura 24).

A



B

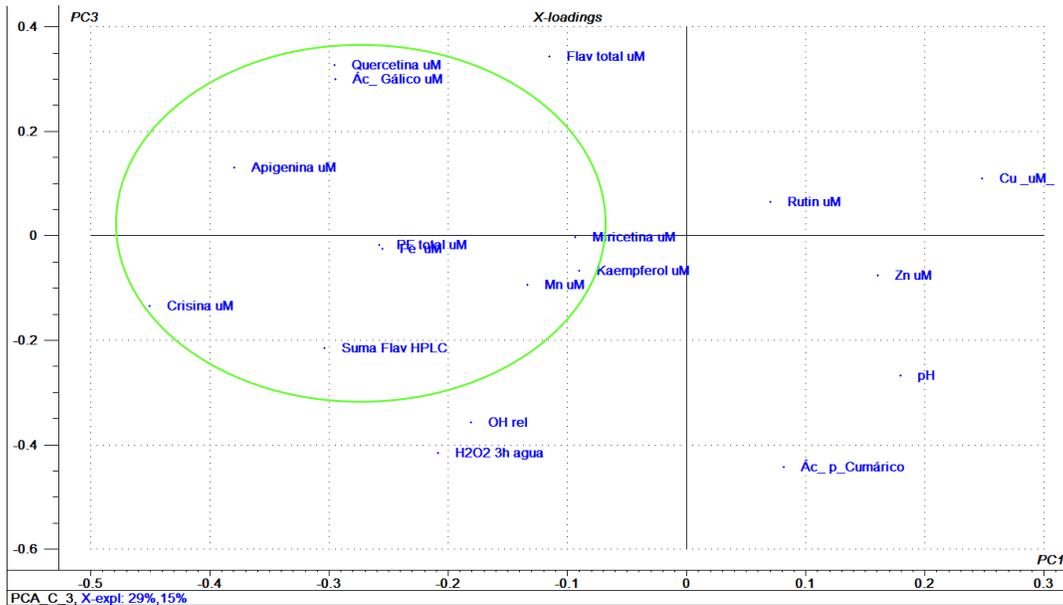


Figura 23. Gráficos de variables (loading), donde se observa A) PC1 v/s PC2 y B) PC1 v/s PC3. Se percibe en el óvalo verde, la relación en primera instancia entre la acumulación de H₂O₂ (en medio acuoso a las 3h), radical hidroxilo, la suma de los flavonoides identificados por HPLC, crisina, apigenina, polifenoles totales, ácido gálico, quercetina y Fe.

Tabla 11. Tabla de correlaciones individuales (r) y significancia ($p \leq 0,05$) con la acumulación de peróxido de hidrógeno.

	r	p-value
pH	0,1797	0,3796
Flavonoides Totales	-0,0417	0,8396
Polifenoles totales	0,2883	0,1531
Ácido gálico	0,3823	0,0654
Ácido cafeico	0,3659	0,5447
Ácido p-coumarico	0,4800	0,0701
Ácido ferúlico	0,9320	0,2361
Miricetina	0,8954	0,2937
Quercetina	-0,0843	0,7088
Apigenina	0,5962	0,1576
Kaempferol	0,5474	0,0528
Crisina	0,5414	0,0113
Cobre	-0,2160	0,2892
Hierro	0,3889	0,0496
Manganeso	0,2180	0,2847
Zinc	-0,0712	0,7295
Σ Flavonoides HPLC	0,6403	0,0004

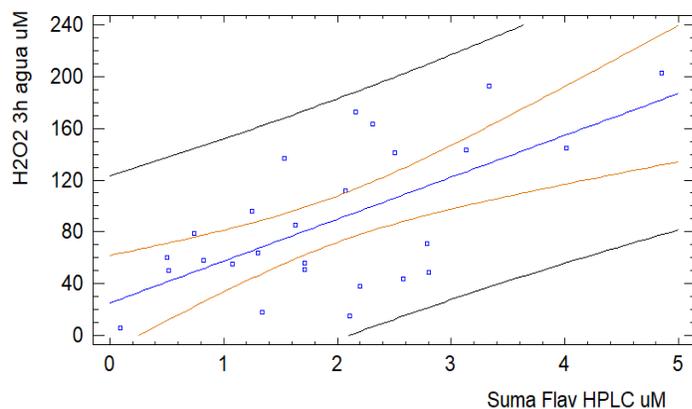


Figura 24. Correlación entre la producción de H_2O_2 y la suma de flavonoides identificados por cromatografía líquida ($p= 0,0004$).

Esto evidencia la relevancia que tiene este grupo de compuestos actuando en conjunto sobre la generación de H_2O_2 en la miel. Tal como se había indicado en la sección 1.1.3 (Rol de los polifenoles y metales en la propiedad antibacteriana de la miel); las flavonas (apigenina y crisina) y los flavonoles (quercetina, kaempferol y miricetina) tiene la capacidad de quelar metales de transición debido a la estructura favorable que presentan (3-hidroxi- 4-ceto en el anillo C para los flavonoles y 5,6,7 trihidroxilo en el anillo A en las flavonas), tal como se presentó en la figura 8. Esto facilitaría la autooxidación de estos flavonoides con la consiguiente generación de radical superóxido (figura 25); la posterior formación de H_2O_2 y del radical hidroxilo debido a las reacciones Fenton y tipo Fenton que estén sucediendo.

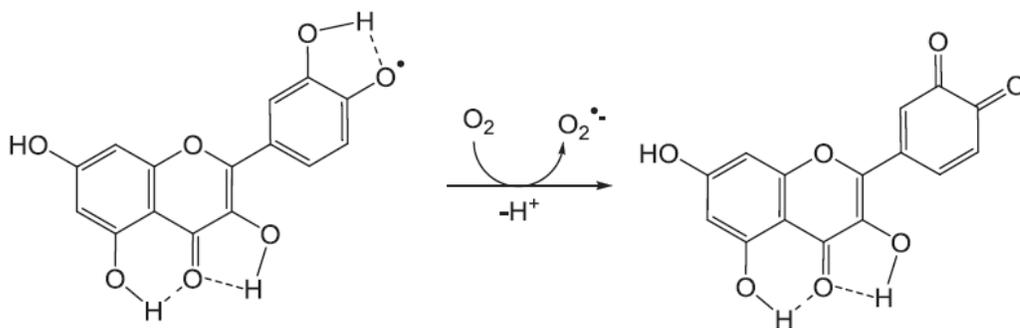


Figura 25. Actividad prooxidante de los flavonoides. Posterior la generación del radical superóxido una serie de reacciones llevan a la generación de peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo

Además, destacan las correlaciones del H₂O₂ con crisina y hierro, indicando la importancia de esta flavona y del metal como modulador de la acción prooxidante de la miel. Cabe señalar que el kaempferol igualmente tendría un papel importante en este sentido; ya que el valor de p para la correlación fue muy cercano a 0,05 (ver tabla 11).

PLS es un método de modelado bilineal en el que la información de los datos originales (matriz X) se proyecta en una pequeña cantidad de variables subyacentes (“latentes”) denominadas componentes PLS. Los datos y (variable dependiente) se utilizan activamente en la estimación de las variables latentes para garantizar que los primeros componentes sean los más relevantes para predecir la variable y. El algoritmo PLS construye estos componentes considerando los valores de respuesta observados (y), comparando estos valores con los valores predichos (\hat{y}); después de lo cual se genera un modelo con poder predictivo confiable (Wold et al., 2001). La interpretación de la relación entre los datos X e y se simplifica, ya que esta se concentra en el menor número posible de componentes. Como resultado final, la variable y puede modelarse directamente a partir de las variables X a través de un vector de coeficientes de regresión B; el que posee b_i componentes (i: variables independientes) que caracterizan la influencia de cada variable X independiente en el modelo. Además, al graficar los primeros componentes de PLS, se pueden visualizar las principales asociaciones entre las variables X e y; así como las interrelaciones dentro de las variables X.

En este caso, la matriz X corresponde a la caracterización química de la miel y el vector y corresponde a la acumulación de H₂O₂ a las 3 horas en medio acuoso (se escogió esta variable por ser la condición más representativa), concentración relativa de radicales hidroxilo o actividad antibacteriana (MIC para *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*). Las concentraciones en ug/g de los componentes de la miel fueron convertidos a uM, considerando una solución al 20% p/v, de manera que se pudiesen establecer relaciones molares entre las variables. El PLS se realizó sobre la matriz X estandarizada para dar a todas las variables la misma oportunidad de influir en la estimación de los componentes, con una validación cruzada total para seleccionar el número de componentes relevantes minimizando el error cuadrático medio de la predicción (RMSEP).

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}}$$

En la anterior ecuación, n corresponde al número de muestras, y_i a los valores medidos e \hat{y}_i a los valores predichos por el modelo. Es importante puntualizar que los modelos PLS obtenidos buscan explicar la variable y en función de las variables independientes X sin ser predictivos; ya que no es su objetivo realizar predicciones futuras. Por lo tanto, no es necesario realizar una validación externa.

La figura 26, presenta el gráfico de las diferentes variables independientes y la acumulación de H_2O_2 a las 3 horas, para los dos primeros componentes PLS presentados en ejes cartesianos, los que representan el 62% de la variabilidad de la variable y . Se confirma la existencia de una relación directa entre la acumulación del peróxido de hidrógeno y la sumatoria de los flavonoides identificados por HPLC, kaempferol, crisina, ácido p-cumárico, polifenoles totales, manganeso y hierro.

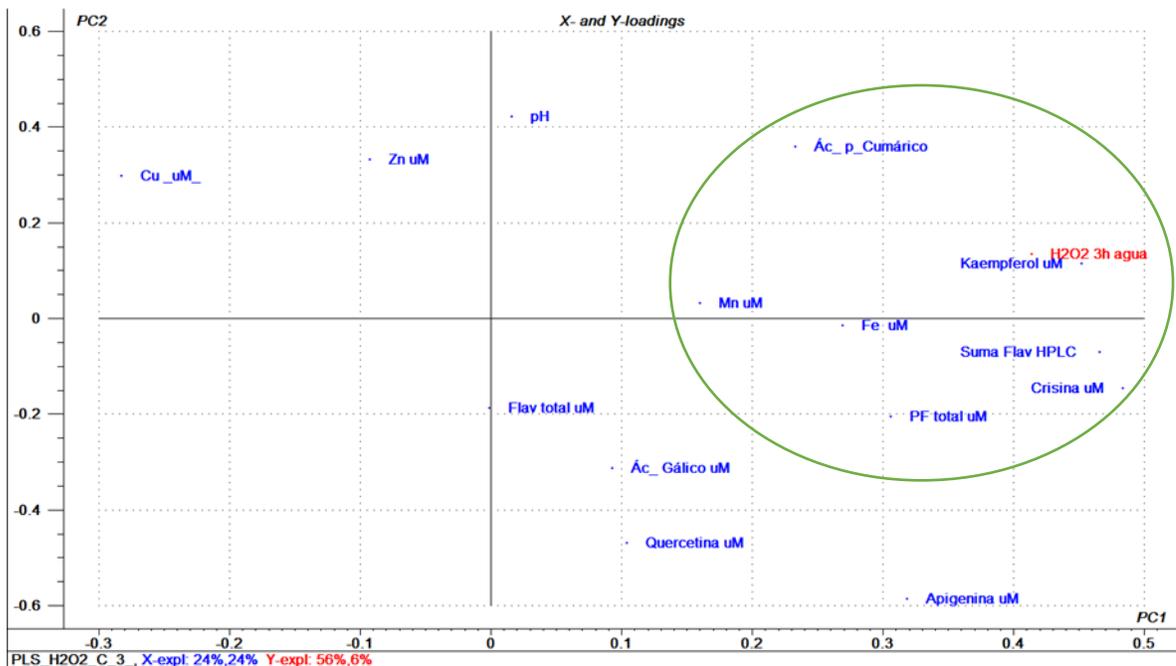


Figura 26. Gráfico de X/ Y loading, Donde la variable dependiente (Y), es la acumulación de H_2O_2 a las 3 horas en medio acuoso, en función de una matriz de variables independientes (X)

De forma complementaria, en la figura 27, se presentan los coeficientes de regresión (b_i) de cada variable del modelo que describe la acumulación de H₂O₂. Se observa que pH, p-cumárico, kaempferol, crisina, la sumatoria de los flavonoides identificados por cromatografía, manganeso y hierro, son las variables que tienen un efecto positivo en la generación de H₂O₂. Estas variables tienen un efecto predominantemente prooxidante, cuyos principales actores son los flavonoides a través de su autooxidación y producción de radical superóxido, como se presentó en la figura 25. Por otra parte, esta autooxidación es facilitada si previamente los flavonoides forman complejos con cationes de metales de transición (figura 8), con la consiguiente generación de H₂O₂.

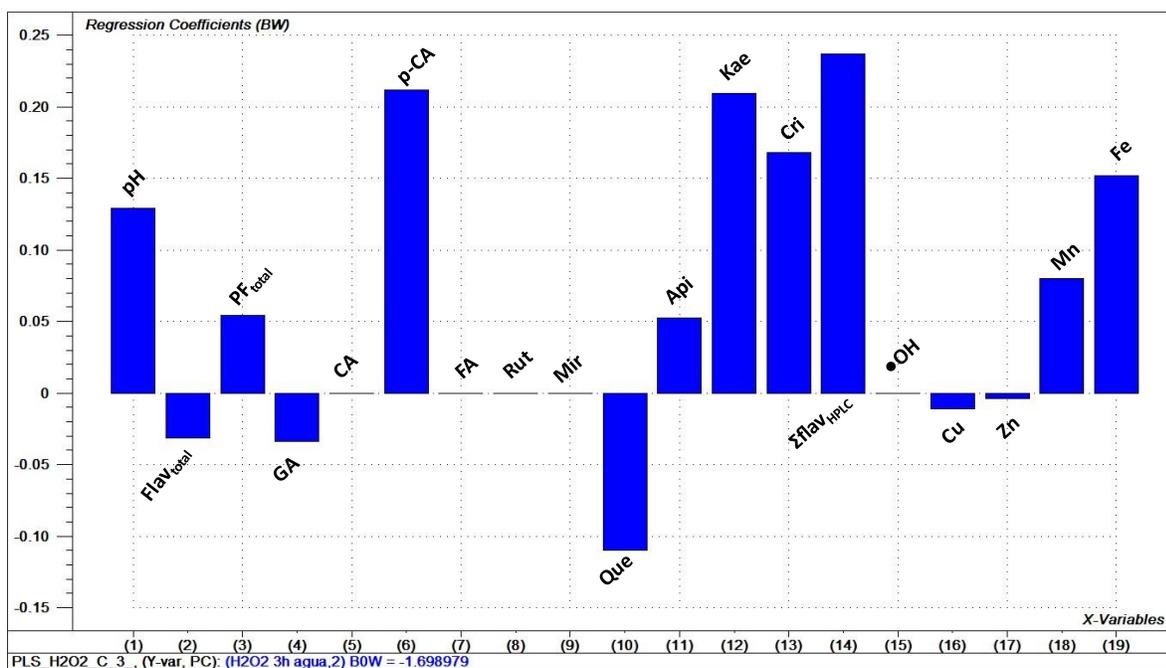


Figura 27. Coeficientes de regresión modelo PLS. Barras con valor positivo corresponde a variables con efecto prooxidante relacionados directamente con la generación de H₂O₂ (pH, ácido p-cumarico, kaempferol, crisina, suma flavonoides identificados, Mn y Fe). Barras con valores negativos, son variables con efecto antioxidante (quercetina).

En tanto la quercetina presentó un efecto negativo sobre la generación de peróxido de hidrógeno, por lo que predomina su acción antioxidante en la miel. El mismo efecto antioxidante, aunque no significativo, presentó el Cu (II). Estudios efectuados en nuestro laboratorio (Sanhueza 2021), evaluaron la producción de H_2O_2 en medio de una miel sintética por parte de las flavonas apigenina y crisina y de los flavonoles quercetina, kaempferol y miricetina en ausencia y presencia de Cu^{2+} , observando un marcado efecto sinérgico prooxidante entre la quercetina y el Cu^{2+} . Este efecto fue menor para miricetina y kaempferol y prácticamente nulo para crisina y apigenina; en cuyo caso la producción de H_2O_2 fue independiente de la presencia de Cu (II). En el presente estudio con muestras reales, similar a lo observado en las mieles sintéticas, crisina, apigenina y kaempferol ejercen una acción prooxidante con independencia del Cu (II). Sin embargo, la dupla quercetina-Cu (II) presenta un efecto antioxidante antes que prooxidante, donde las condiciones químicas y composición de la matriz generan efectos antagónicos con un resultado neto de generación de ROS. En este sentido cabe señalar que se ha descrito que los complejos entre flavonoides y metales tienen un mayor efecto antioxidante que los flavonoides puros, particularmente en el caso de quercetina-Cu (II) (Bukhari et al., 2009). Por otra parte, se ha descrito que la acción prooxidante/antioxidante del par quercetina-Cu (II) depende de la concentración de la quercetina (efecto sintonizable basado en concentración); siendo prooxidante a bajas concentraciones y antioxidante a mayores, manifestado en su acción oxidativa sobre DNA (Yamashita et al., 1999).

La figura 28 presenta el gráfico de las diferentes variables independientes y la generación relativa del radical hidroxilo, para los dos primeros componentes PLS presentados en ejes cartesianos, los que representan el 56% de la variabilidad de la variable y. En esta podemos percibir que existe una relación directa entre el radical hidroxilo y los contenidos de ácido p-cumárico, crisina, kaempferol, la suma de flavonoides determinados por HPLC, manganeso, hierro y acumulación de H_2O_2 en agua. Este patrón de relación es similar al observado para la relación entre la acumulación de H_2O_2 y las variables independientes; lo que es esperable dada la relación que hay a su vez entre ambas especies de ROS.

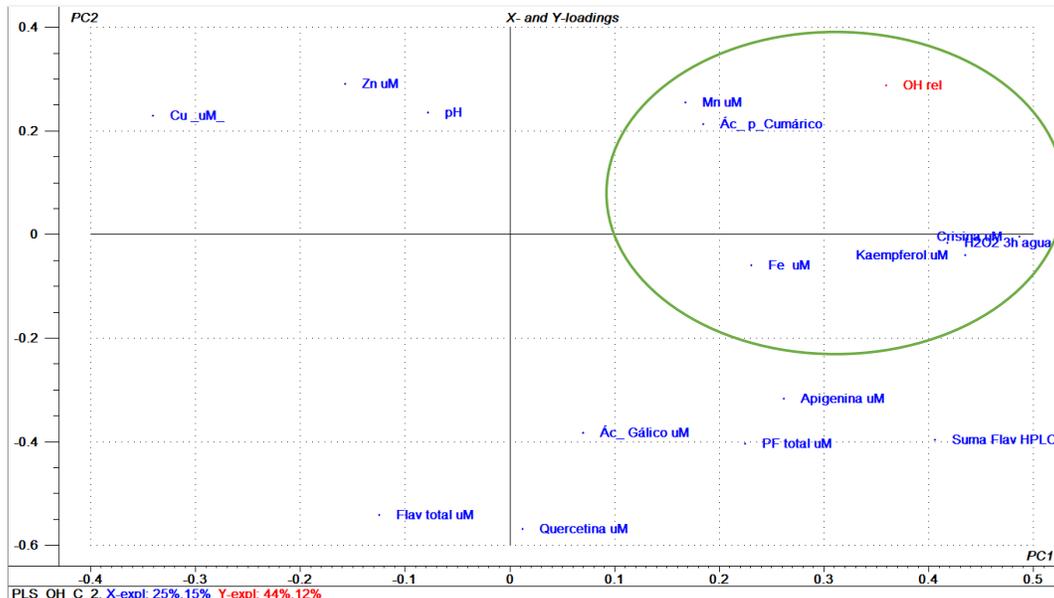


Figura 28. Gráfico de X/ Y loading, Donde la variable dependiente (Y), es la generación de radical hidroxilo, en función de una matriz de variables independientes (X).

En la figura 29, se presentan los coeficientes de regresión (b_i) de cada variable del modelo que describe la generación del radical hidroxilo. Se observa que ácido p-cumárico, apigenina, kaempferol, crisina, la suma de flavonoides determinados por HPLC, acumulación de H_2O_2 en agua, manganeso y hierro tienen un efecto pro-oxidante asociado a la generación de radical OH. En tanto que los flavonoides totales, la quercetina, Cu y Zn presentaron una acción antioxidante asociados a un efecto apagador del radical hidroxilo. Similar a lo descrito previamente para la acumulación de H_2O_2 ; esta acción antioxidante se podría asociar la capacidad atrapadora de los radicales hidroxilos que tendrían los complejos entre quercetina y Cu (II) o Zn (II).

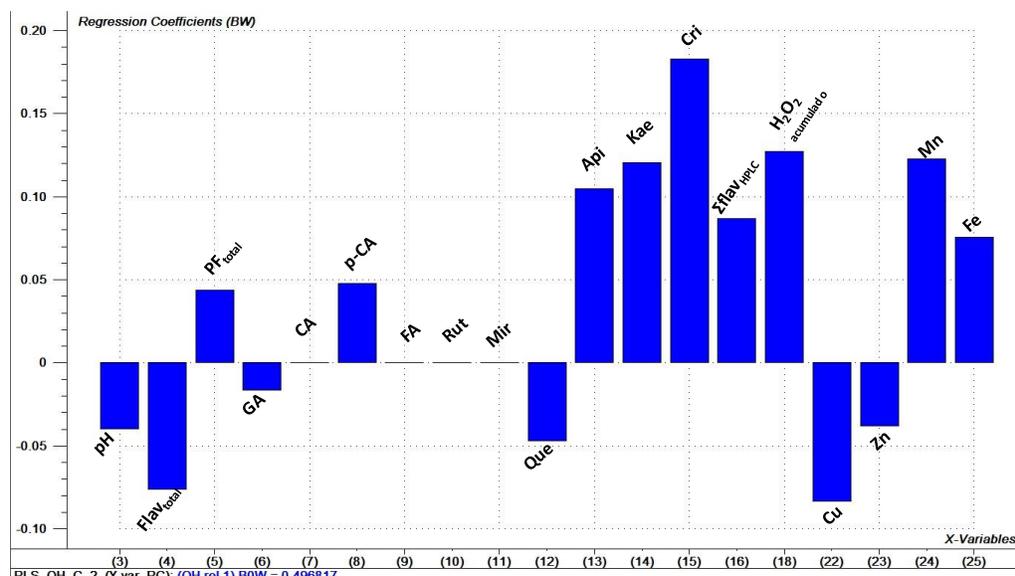


Figura 29. Coeficientes de regresión del modelo PLS. Barras con valor positivo corresponde a variables con efecto prooxidante relacionados directamente con la generación del radical hidroxilo (ácido p-cumarico, apigenina, kaempferol, crisina, suma flavonoides identificados, Mn y Fe). Barras con valores negativos, son variables con efecto antioxidante (flavonoides totales, quercetina, Cu y Zn).

Entre todas las propiedades descritas que poseen los polifenoles, su actividad antioxidante es la que mayormente se ha estudiado desde un punto de vista médico, nutricional y farmacéutico (Pérez Trueba, 2003). Esta se asocia a la capacidad que estos tienen de formar complejos con metales de transición, tal como el hierro, y reaccionar con radicales libres, evitando la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ali et al., 2017).

Sin embargo, los efectos prooxidantes de estos mismos compuestos son igualmente relevantes en diferentes medios y alimentos; como lo que se observa para la miel en el presente estudio. En este sentido, estudios sobre la oxidación del vino blanco dan cuenta de la importancia que sobre esta tiene la presencia de polifenoles que tienen en sus estructuras unidades catecol (1,2-dihidroxibenceno) o galoilo (1,2,3-trihidroxibenceno), como es el caso de las flavonas y flavonoles presentes en la miel, que se oxidan secuencialmente a semiquinonas y quinonas con la consiguiente formación de ROS. En esta reacción los metales de transición juegan un rol modulador al complejarse con los flavonoides, facilitando su oxidación por parte del oxígeno disuelto (autooxidación), debido a la modificación de sus potenciales redox, con posterior formación de H₂O₂. Los mismos cationes metálicos por medio de la reacción Fenton (con Fe (II))

o tipo Fenton (con Cu(I)) oxidan el peróxido de hidrogeno para la formación de radicales hidroxilos, prevaleciendo una acción prooxidante (Márquez, Contreras, et al., 2019; Márquez, Pérez-Navarro, et al., 2019).

Debido a la presencia de componentes similares a los presentes en el vino, es probable que un mecanismo semejante ocurra en la miel; donde se presenta la generación de peróxido de hidrógeno como producto de la autooxidación de flavonas y flavonoles y la generación de radical hidroxilo por la reacción Fenton favorecida por la presencia de Fe (II). Por otra parte, el rol prooxidante que estarían ejerciendo los flavonoides de las mieles analizadas tiene relación con la concentración en que se encuentran; ya que se ha descrito que este efecto se observa a bajas concentraciones (Situación que se presentaría en la miel); mientras que la acción antioxidante se presenta a concentraciones mayores. (Pérez Trueba, 2003), Otros factores que influyen en la materialización del efecto prooxidante son la estabilidad del radical del flavonoide que se forma, el cambio en el potencial de reducción del complejo flavonoide-metal, el comportamiento quelante de las especies; el pH y la estabilidad del radical fenoxilo. En este sentido, crisina, kaempferol y apigenina, que demuestra tener un efecto positivo en la generación del radical hidroxilo, son fitofenoles en sistemas redox-activos, donde actúan como especies prooxidantes, pues el oxígeno en presencia de estos flavonoides y de metales de transición, tal como los identificados y cuantificados en este estudio, forman especies reactivas de oxígeno que tienen la capacidad de dañar el ADN y otras moléculas de importancia biológica, formando aductos de ADN, con efectos mutagénicos y toxicidad (Sakihama, 2002).

La figura 31 presenta el gráfico de las variables independientes y la concentración mínima inhibitoria (MIC) sobre *S. epidermidis*, como una medida de la actividad antibacteriana contra esta bacteria; para los dos primeros componentes PLS, los que representan el 68% de la variabilidad de la variable y. Por otra parte, en la figura 32, se presentan los coeficientes de regresión (b_i) de cada variable del modelo que describe esta actividad antibacteriana. Se observa que polifenoles y flavonoides totales, ácido gálico, el contenido de kaempferol, acumulación de peróxido de hidrogeno y hierro tienen un efecto positivo en la inhibición de esta bacteria Grampositiva. Esto demuestra el importante acción del H_2O_2 y los polifenoles contra este tipo de bacteria, la que posee membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una capa de peptidoglicano, sensible a la acción de este agente oxidante. El importante papel conjunto que tienen el H_2O_2 y los polifenoles de la miel en su actividad antibacteriana ha sido efectivamente descrito (Bucekova et al., 2018, 2019).

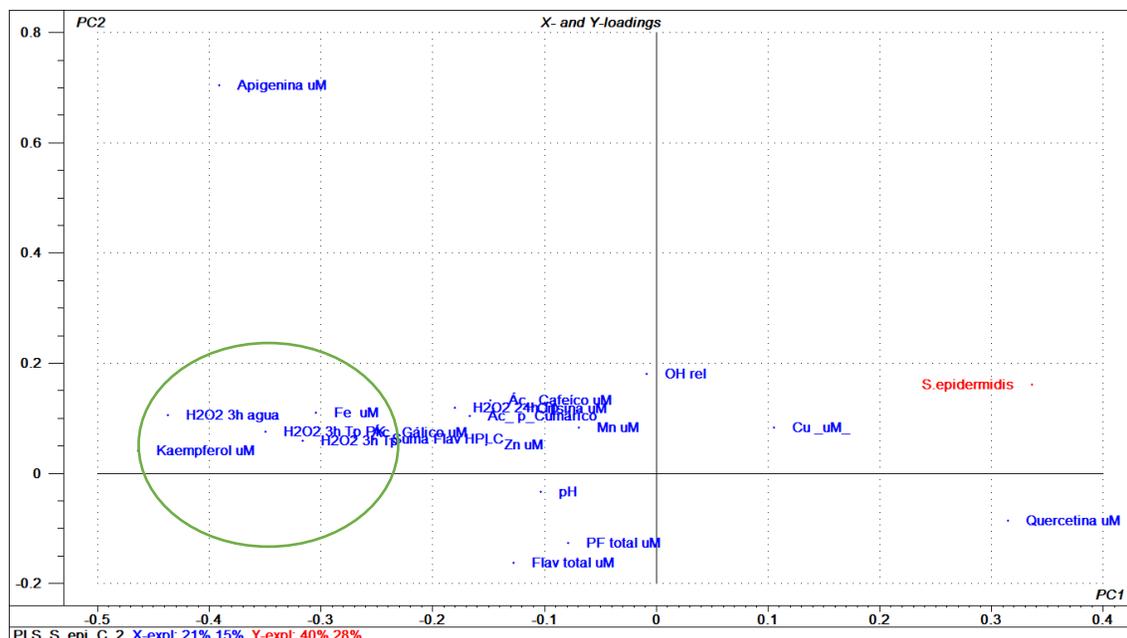


Figura 30. Gráfico de X/ Y loading, Donde la variable dependiente (Y), corresponde a la MIC para *S. epidermidis*, en función de una matriz de variables independientes (X).

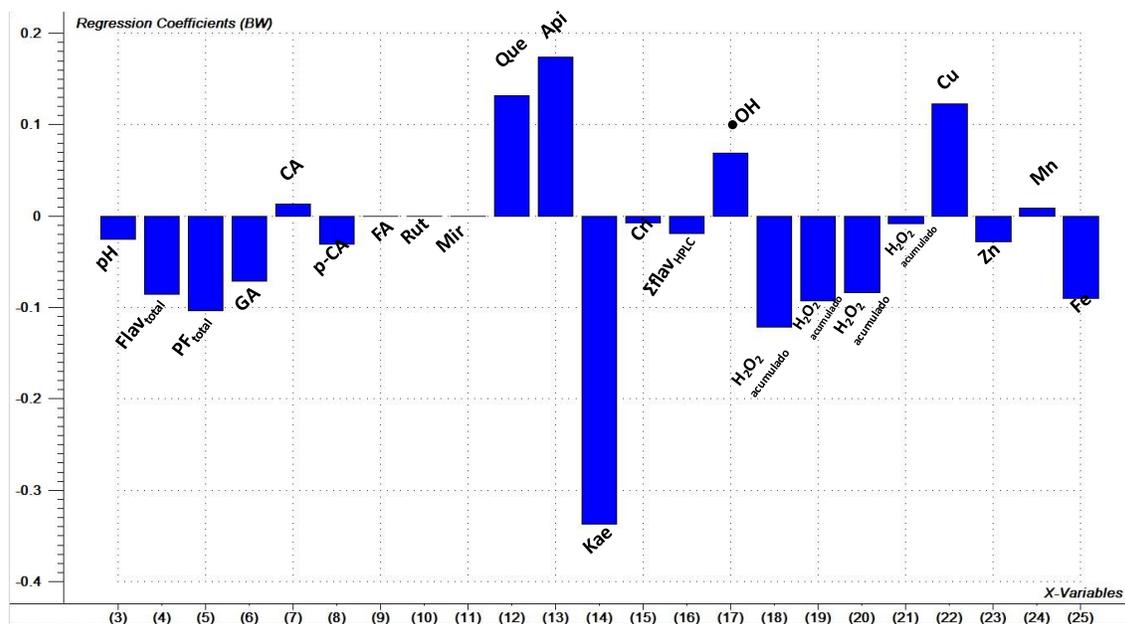


Figura 31. Coeficientes de regresión del modelo PLS. Las barras negativas son los factores que están directamente relacionados con la acción antibacteriana (MIC) sobre *S. epidermidis* (polifenoles y flavonoides totales, ácido gálico, kaempferol, acumulación de H_2O_2 y el contenido de hierro)

La generación de H_2O_2 sería a su vez estimulada por el hierro al complejarse con los flavonoides, lo que explica el efecto positivo de este ion. Además, Fe (III) participaría en la escisión oxidativa del ADN bacteriano inducida por complejos flavonoide-Fe (III) (el Amrani et al., 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) (Fig. 33). 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.

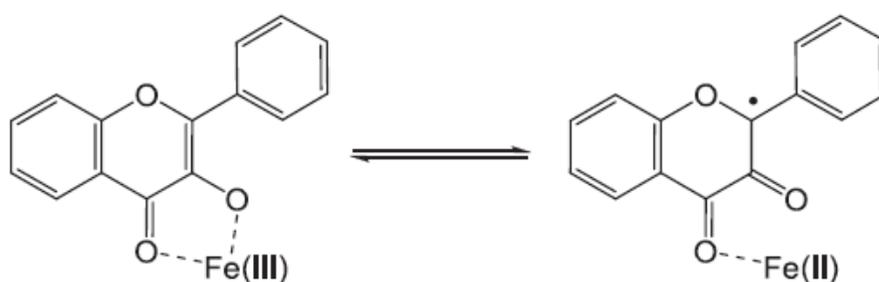


Figura 32. Ruta propuesta para la generación del complejo Fe (II)-flavonoide a partir del complejo Fe (III)-flavonoide; el que produciría una escisión oxidativa del ADN bacteriano

En tanto de las 15 mieles a las que se determinó el MIC, solamente 7 presentaron kaempferol cuantificable; por lo que la relación con este flavonoide en particular podría no ser concluyente. Por otra parte, al igual que lo ocurrido con la generación de H_2O_2 y radical hidroxilo; quercetina y cobre presentaron un efecto negativo sobre la inhibición; lo que podría asociarse a su efecto antioxidante conjunto como interferente con la acción de los ROS sobre la bacteria. Como se mencionó previamente, la acción antioxidante y de protección del DNA por parte del par quercetina-Cu (II) se daría cuando la concentración de la quercetina duplica la del DNA (Yamashita et al., 1999), lo que podría ser el caso presente. Por otra parte, en estas relaciones multifactoriales no es evidente la interpretación del efecto negativo que presenta la acumulación de radical hidroxilo sobre la actividad antibacteriana contra *S. epidermidis*.

La figura 33 presenta el gráfico de las diferentes variables independientes y la concentración mínima inhibitoria (MIC) sobre *P. aeruginosa*, como una medida de la actividad antibacteriana contra esta bacteria; para los dos primeros componentes PLS, los que representan el 52% de la variabilidad de la variable y. Por otra parte, en la figura 34, se presentan los coeficientes de regresión (b_i) de cada variable del modelo que describe esta actividad antibacteriana. Se observa que la actividad antibacteriana sobre esta bacteria se ve favorecida por el pH, polifenoles y flavonoides totales que contienen las mieles. Mientras que todos los flavonoides de forma individual y la suma de estos la desfavorecen. Cabe señalar que la determinación de polifenoles y flavonoides totales no es selectiva; por lo que en esta variable pueden estar contenidos otros compuestos que pudiesen tener un efecto en la actividad antibacteriana de la miel.

A diferencia de lo observado para *S. epidermidis*, el H_2O_2 generado por la miel no fue relevante para su acción contra *P. aeruginosa*; tal como ha sido reportado en varios estudios que incluyen esta bacteria Gram negativa y otras Gram positivas (Bucekova et al., 2018, 2019; Cebrero et al., 2020); donde se muestra además que los MIC para *P. aeruginosa* son mayores que para bacterias Gram positivas; lo que igualmente se observó en el presente estudio. Esta diferencia tiene una probable relación con las diferencias morfológicas entre estas bacterias; ya que *P. aeruginosa* presenta una membrana lipídica externa a la pared celular de peptidoglicano que la protege de antibióticos, detergentes y probablemente de los ROS generado por la miel. Esta misma resistencia a los ROS se vería beneficiada por la capacidad de los flavonoides de atraparlos, teniendo así un efecto desfavorecedor de la actividad contra esta bacteria, como se observa en la figura 30. Tal como en el caso de *S. epidermidis*, en estas relaciones multifactoriales no es evidente la interpretación del efecto negativo que presenta la acumulación de radical hidroxilo sobre la actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa*.

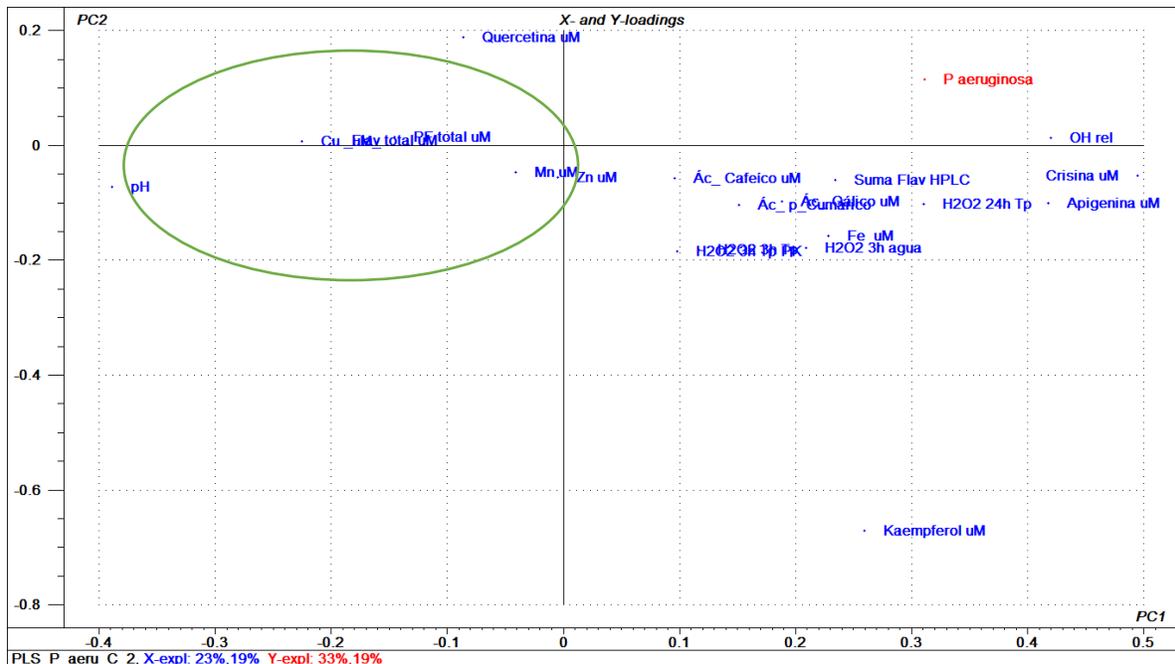


Figura 33. Gráfico de X/ Y loading, Donde la variable dependiente (Y), corresponde a la concentración mínima inhibitoria para impedir el crecimiento de *P. aeruginosa*, en función de una matriz de variables independientes (X).

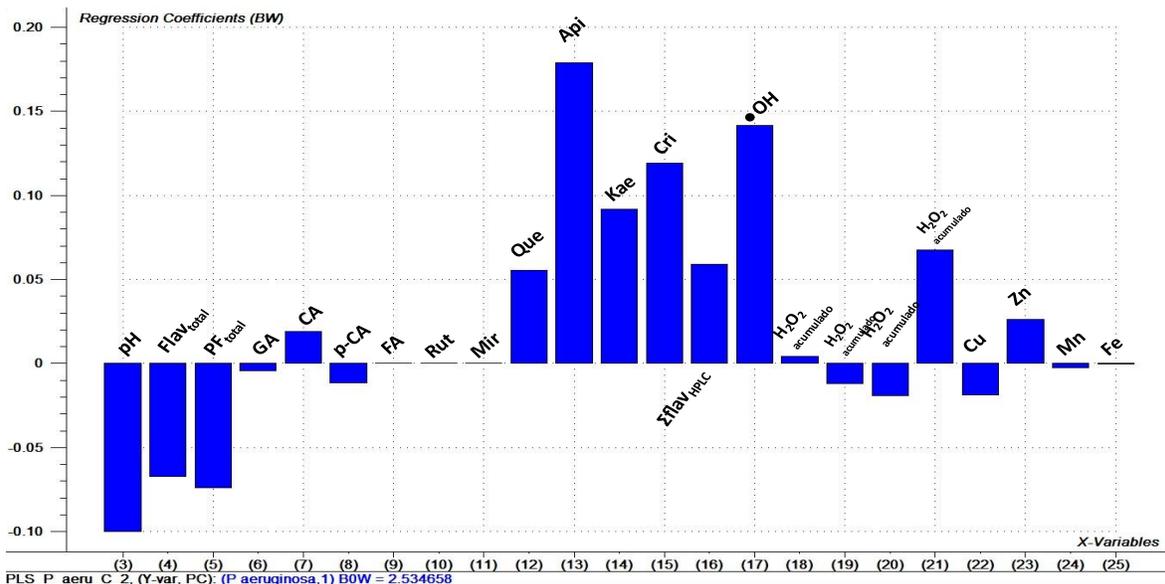


Figura 34. Coeficientes de regresión del modelo PLS. Las barras negativas son los factores que están directamente relacionados con la acción antibacteriana (MIC) sobre *P. aeruginosa* (pH, polifenoles y flavonoides totales).

En términos generales se puede indicar que los polifenoles (ácidos fenólicos y flavonoides), presentes en la miel tienen particular relevancia en el control de la proliferación de ambas bacterias consideradas en este estudio; siendo el H₂O₂ igualmente relevante para la bacteria Gram positiva. En este sentido, varios reportes dan cuenta del rol que juegan los polifenoles y en específico los flavonoides en la actividad antibacteriana. Cushnie & Lamb, (2011), determinaron que aquellos compuestos donde el anillo B se une en la posición 2 del anillo C en lugar de la posición 3, como quercetina, miricetina, kaempferol, presentan mayor actividad antibacteriana; actuando mediante tres mecanismos posibles: 1) dañando la membrana plasmática de la bacteria, 2) inhibiendo la síntesis de los ácidos nucleicos o 3) inhibiendo la generación de energía por el metabolismo. Por otra parte, Nishino et al., (1987) determinaron que flavonas y flavonoles tuvieron una mayor incidencia en inhibir el crecimiento de *S. epidermidis*, atribuyéndolo a la co-planaridad molecular de los anillos A y C (fusionados) que estas moléculas presentan (Figura 4). Esta co-planaridad les permite intercalarse, bajo la forma de complejos con Cu (II), en las cadenas del ADN bacteriano actuando a corta distancia vía autooxidación y generación de ROS, con el consiguiente daño oxidativo del material genético (Tan et al., 2009; Yamashita et al., 1999). La participación del cobre, hierro, manganeso y cinc; dan cuenta del efecto modulador de la actividad antibacteriana de la miel, asociada a flavonoides, que tienen los metales de transición. Por otra parte, en el caso de los flavonoles y catequinas, el doble enlace en la posición 2,3, conjugado con la función 4-oxo del anillo C, sería de gran importancia para la actividad antioxidante y antibacteriana (Nishino et al., 1987; Procházková et al., 2011).

7.-CONCLUSIONES.

Se evaluó el perfil de ácidos fenólicos y flavonoides; contenido de Fe, Zn, Mn y Cu; acumulación de peróxido de hidrógeno; generación de radical hidroxilo y concentración mínima inhibitoria de bacterias de Gram (+) y Gram (-) de veintiséis mieles nacionales recolectadas entre la IV y X regiones. La información recolectada se empleó para establecer relaciones multivariadas entre los componentes de la miel, su producción de ROS y actividad antibacteriana mediante PCA y PLS.

Los compuestos fenólicos que se presentaron con mayor frecuencia en las mieles fueron ácido gálico, ácido p-cumárico, quercetina, kaempferol, apigenina y crisina. Mientras que la concentración de metales fue $Fe > Cu > Zn > Mn$. Todas las mieles mostraron acumulación de H_2O_2 (1.0-35 $\mu g/g$; máxima a las 3 horas) y formación de radicales OH. Las mieles tuvieron un valor MIC más bajo contra *S. epidermidis* que contra *P. aeruginosa* (promedio 10 y 18% v/v, respectivamente).

Con excepción de la quercetina, los polifenoles tienen un efecto prooxidante estimulando la generación de ROS; particularmente crisina, kaempferol, ácido gálico y ácido p-cumárico. De la misma forma Fe y Mn están directamente relacionados con la generación de especies reactivas de oxígeno, esto posiblemente sucede por estimulación de la autooxidación de los flavonoides; mientras que Cu favorece la acción antioxidante de aquellos.

Los compuestos fenólicos, como conjunto más que de forma individual, tienen un efecto significativo sobre la actividad antibacteriana de la miel contra *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*. El H_2O_2 determina principalmente la actividad antibacteriana frente a *S. epidermidis*, debido a la sensibilidad de esta bacteria a dicho compuesto. Por el contrario, *P. aeruginosa* es menos sensible que *S. epidermidis* a los ROS, probablemente debido a los múltiples mecanismos de resistencia al estrés oxidativo y morfología de las bacterias Gram negativa.

La actividad antibacteriana estaría conectada en gran medida con el origen botánico de la planta, dado que el perfil y cantidad de compuestos fenólicos influyen en la generación de ROS; los que a su vez participan en la inhibición del crecimiento bacteriano y la degradación del ADN a través del daño oxidativo. Esta acción es modulada por otros factores, como hierro, manganeso y cobre.

8.-REFERENCIAS.

- Ahmad, M. S., Fazal, F., Rahman, A., Hadi, S. M., & Parish, J. H. (1992). Activities of flavonoids for the cleavage of DNA in the presence of Cu (II): correlation with generation of active oxygen species. *Carcinogenesis*, 13(4), 605–608. <https://doi.org/10.1093/carcin/13.4.605>
- Ali, F., Rahul, Naz, F., Jyoti, S., & Siddique, Y. H. (2017). Health functionality of apigenin: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(6), 1197–1238. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1207188>
- Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Díaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., Damiani, E., Astolfi, P., Bompadre, S., & Battino, M. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8–9), 2490–2499. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.021>
- Alvarez-Suarez, J., Tulipani, S., Romandini, S., Vidal, A., & Battino, M. (2009). Methodological Aspects about Determination of Phenolic Compounds and In Vitro Evaluation of Antioxidant Capacity in the Honey: A Review. *Current Analytical Chemistry*, 5(4), 293–302. <https://doi.org/10.2174/157341109789077768>
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry* (4th ed.). Springer.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. (2008). Honey for Nutrition and Health: A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 677–689. <https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719745>
- 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>
- Bridi, R., Atala, E., Pizarro, P. N., & Montenegro, G. (2019). Honeybee Pollen Load: Phenolic Composition and Antimicrobial Activity and Antioxidant Capacity. *Journal of Natural Products*, 82(3), 559–565. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00945>
- Brudzynski, K., Abubaker, K., Laurent, M., & Castle, A. (2011). Re-Examining the Role of Hydrogen Peroxide in Bacteriostatic and Bactericidal Activities of Honey. *Frontiers in Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00213>
- 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>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00036>

- 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), 9061. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27449-3>
- 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>
- Bukhari, S. B., Memon, S., Mahroof-Tahir, M., & Bhanger, 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>
- Campone, L., Piccinelli, A. L., Pagano, I., Carabetta, S., di Sanzo, R., Russo, M., & Rastrelli, L. (2014). Determination of phenolic compounds in honey using dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1334, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.081>
- Cabrero, 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>
- Cheung, Y., Meenu, M., Yu, X., & Xu, B. (2019). Phenolic acids and flavonoids profiles of commercial honey from different floral sources and geographic sources. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 290–308. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1579835>
- Cilia, G., Fratini, F., Marchi, M., Sagona, S., Turchi, B., Adamchuk, L., Felicioli, A., & Kačaniová, M. (2020). Antibacterial Activity of Honey Samples from Ukraine. *Veterinary Sciences*, 7(4), 181. <https://doi.org/10.3390/vetsci7040181>
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38(2), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014>
- 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>
- Degirmenci, A., Can, Z., Boyraci, G. M., Yildiz, O., Asadov, E., & Kolayli, S. (2020). Honeys from some different regions of Azerbaijan: bioactive characteristics based on phenolic profile and antioxidant activity. *Journal of Apicultural Research*, 59(4), 390–397. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1726033>
- Dimitrova, B., Gevrenova, R., & Anklam, E. (2007). Analysis of phenolic acids in honeys of different floral origin by solid-phase extraction and high-performance liquid

- chromatography. *Phytochemical Analysis*, 18(1), 24–32. <https://doi.org/10.1002/pca.948>
- 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>
- el Sohaimy, S. A., Masry, S. H. D., & Shehata, M. G. (2015). Physicochemical characteristics of honey from different origins. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), 279–287. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2015.10.015>
- Engin Gündoğdu, Songül Çakmakçı, & İhsan Güngör Şat. (2019). An Overview of Honey: Its Composition, Nutritional and Functional Properties. *Journal of Food Science and Engineering*, 9(1). <https://doi.org/10.17265/2159-5828/2019.01.003>
- Farkasovska, J., Bugarova, V., Godocikova, J., Majtan, V., & Majtan, J. (2019). The role of hydrogen peroxide in the antibacterial activity of different floral honeys. *European Food Research and Technology*, 245(12), 2739–2744. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03393-y>
- Ferreira, I. C. F. R., Aires, E., Barreira, J. C. M., & Estevinho, L. M. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, 114(4), 1438–1443. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.028>
- Giordano, A., Retamal, M., Fuentes, E., Ascar, L., Velásquez, P., Rodríguez, K., & Montenegro, G. (2019). Rapid Scanning of the Origin and Antioxidant Potential of Chilean Native Honey Through Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *Food Analytical Methods*, 12(7), 1511–1519. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01473-z>
- GRABEK-LEJKO, D., SŁOWIK, J., & KASPRZYK, I. (2018). Activity of selected honey types against *Staphylococcus aureus* methicillin susceptible (MSSA) and methicillin resistant (MRSA) bacteria and its correlation with hydrogen peroxide, phenolic content and antioxidant capacity. *Farmacia*, 66, 37–43.
- Gül, A., & Pehlivan, T. (2018). Antioxidant activities of some monofloral honey types produced across Turkey. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(6), 1056–1065. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.02.011>
- Higuera Cobos, Ö. F., & Tristancho Reyes, J. L. (2006). ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LA REDUCCIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO SOBRE ALEACIONES UTILIZADAS EN LA INDUSTRIA JOYERA. *Scientia et Technica*, 1, 349–354.
- Hungerford, N. L., Tinggi, U., Tan, B. L. L., Farrell, M., & Fletcher, M. T. (2020). Mineral and Trace Element Analysis of Australian/Queensland *Apis mellifera* Honey. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 6304. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176304>

- Karasawa, K., Kato, M., & Arakawa, H. (2020). Analysis of Bactericidal Components in Japanese honeys. *American Journal of Analytical Chemistry*, *11*(08), 309–321. <https://doi.org/10.4236/ajac.2020.118025>
- Kenjeric, D., Mandic, M., Primorac, L., Bubalo, D., & Perl, A. (2007). Flavonoid profile of Robinia honeys produced in Croatia. *Food Chemistry*, *102*(3), 683–690. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.055>
- Kwakman, P. H. S., te Velde, A. A., de Boer, L., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., & Zaat, S. A. J. (2011). Two Major Medicinal Honeys Have Different Mechanisms of Bactericidal Activity. *PLoS ONE*, *6*(3), e17709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017709>
- Kwakman, P. H. S., & Zaat, S. A. J. (2012). Antibacterial components of honey. *IUBMB Life*, *64*(1), 48–55. <https://doi.org/10.1002/iub.578>
- Li, Y., & Trush, M. A. (1994). Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Research*, *54*(7 Suppl), 1895s–1898s.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. v., & Clarck, D. (2009). *BROCK BIOLOGY OF MICROORGANISMS*, (12th ed.). PEARSON EDUCACION S.A.
- Majtan, J., Bucekova, M., Kafantaris, I., Szweda, P., Hammer, K., & Mossialos, D. (2021). Honey antibacterial activity: A neglected aspect of honey quality assurance as functional food. *Trends in Food Science & Technology*, *118*, 870–886. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.012>
- Mani, R., & Natesan, V. (2018). Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. *Phytochemistry*, *145*, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.09.016>
- Márquez, K., Contreras, D., Salgado, P., & Mardones, C. (2019). Production of hydroxyl radicals and their relationship with phenolic compounds in white wines. *Food Chemistry*, *271*, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.165>
- Márquez, K., Pérez-Navarro, J., Hermosín-Gutiérrez, I., Gómez-Alonso, S., Mena-Morales, A., García-Romero, E., & Contreras, D. (2019). Systematic study of hydroxyl radical production in white wines as a function of chemical composition. *Food Chemistry*, *288*, 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.005>
- Mejías, E., & Garrido, T. (2017). Analytical Procedures for Determining Heavy Metal Contents in Honey: A Bioindicator of Environmental Pollution. In *Honey Analysis*. InTech. <https://doi.org/10.5772/66328>
- Nishino, C., Enoki, N., Tawata, S., Mori, A., Kobayashi, K., & Fukushima, M. (1987). Antibacterial Activity of Flavonoids against *Staphylococcus epidermidis*, a Skin Bacterium. *Agricultural and Biological Chemistry*, *51*(1), 139–143. <https://doi.org/10.1080/00021369.1987.10867965>

- Oliveira, S. S., Alves, C. N., Boa Morte, E. S., de Freitas Santos Júnior, A., Araujo, R. G. O., & Santos, D. C. M. B. (2019). Determination of essential and potentially toxic elements and their estimation of bioaccessibility in honeys. *Microchemical Journal*, *151*, 104221. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104221>
- Pascual-Maté, A., Osés, S. M., Fernández-Muiño, M. A., & Sancho, M. T. (2018). Methods of analysis of honey. *Journal of Apicultural Research*, *57*(1), 38–74. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1411178>
- Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019). Pseudomonas aeruginosa: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de Infectología*, *36*(2), 180–189. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182019000200180>
- Pérez Trueba, G. (2003). Los Flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, *22*(1), 48–57.
- Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, *63*(7), 1035–1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>
- 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>
- Rahman, A., Shahabuddin, Hadi, S. M., Parish, J. H., & Ainley, K. (1989). Strand scission in DNA induced by quercetin and Cu(II): role of Cu(I) and oxygen free radicals. *Carcinogenesis*, *10*(10), 1833–1839. <https://doi.org/10.1093/carcin/10.10.1833>
- Roshan, A.-R. A., Gad, H. A., El-Ahmady, S. H., Khanbash, M. S., Abou-Shoer, M. I., & Al-Azizi, M. M. (2013). Authentication of Monofloral Yemeni Sidr Honey Using Ultraviolet Spectroscopy and Chemometric Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(32), 7722–7729. <https://doi.org/10.1021/jf402280y>
- Roshan, N., Rippers, T., Locher, C., & Hammer, K. A. (2017). Antibacterial activity and chemical characteristics of several Western Australian honeys compared to manuka honey and pasture honey. *Archives of Microbiology*, *199*(2), 347–355. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1308-3>
- Sakihama, Y. (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)
- Servicio Nacional de Geología y Minería (Chile). (2021). *ANUARIO DE LA MINERÍA DE CHILE 2020*.
- Shahzad, A., & Cohrs, R. J. (2012). In vitro antiviral activity of honey against varicella zoster virus (VZV): A translational medicine study for potential remedy for shingles. *Translational Biomedicine*, *3*(2). <https://doi.org/10.3823/434>

- Sharma, T., Kaur Khurana, R., Borges, B., Kaur, R., Katare, O. P., & Singh, B. (2021). An HPTLC densitometric method for simultaneous quantification of sorafenib tosylate and chrysin: Analytical method development, validation and applications. *Microchemical Journal*, *162*, 105821. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105821>
- Silveira-Júnior, C. E. A., Regina da Silva, G., Pereira Gomes, A. N., Silva, T. M. S. da, Arruda, R., & de Assis Ribeiro dos Santos, F. (2020). Evaluation of honey quality of Northeast of Brazil: botanical origin and heavy metals content. *Journal of Apicultural Research*, *59*(4), 362–377. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1749450>
- Simirgiotis, M. (2013). Antioxidant Capacity and HPLC-DAD-MS Profiling of Chilean Peumo (*Cryptocarya alba*) Fruits and Comparison with German Peumo (*Crataegus monogyna*) from Southern Chile. *Molecules*, *18*(2), 2061–2080. <https://doi.org/10.3390/molecules18022061>
- Socha, R., Juszczak, L., Pietrzyk, S., Gałkowska, D., Fortuna, T., & Witczak, T. (2011). Phenolic profile and antioxidant properties of Polish honeys. *International Journal of Food Science & Technology*, *46*(3), 528–534. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02517.x>
- 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>
- Tan, J., Wang, B., & Zhu, L. (2009). DNA binding and oxidative DNA damage induced by a quercetin copper (II) complex: potential mechanism of its antitumor properties. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *14*(5), 727–739. <https://doi.org/10.1007/s00775-009-0486-8>
- 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>
- Tsavea, E., & Mossialos, D. (2019). Antibacterial activity of honeys produced in Mount Olympus area against nosocomial and foodborne pathogens is mainly attributed to hydrogen peroxide and proteinaceous compounds. *Journal of Apicultural Research*, *58*(5), 756–763. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1649570>
- 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>
- Viteri, R., Zacconi, F., Montenegro, G., & Giordano, A. (2021). Bioactive compounds in *Apis mellifera* monofloral honeys. *Journal of Food Science*, *86*(5), 1552–1582. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15706>

- Wang, J., & Li, Q. X. (2011). Chemical Composition, Characterization, and Differentiation of Honey Botanical and Geographical Origins. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 62, pp. 89–137). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385989-1.00003-X>
- Wang, J., Zhang, T., Du, J., Cui, S., Yang, F., & Jin, Q. (2014). Anti-Enterovirus 71 Effects of Chrysin and Its Phosphate Ester. *PLoS ONE*, 9(3), e89668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089668>
- White, J. W., & Subers, M. H. (1963). Studies on Honey Inhibine. 2. A Chemical Assay. *Journal of Apicultural Research*, 2(2), 93–100. <https://doi.org/10.1080/00218839.1963.11100066>
- Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58(2), 109–130. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1)
- Yamashita, N., Tanemura, H., & Kawanishi, S. (1999). Mechanism of oxidative DNA damage induced by quercetin in the presence of Cu(II). *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 425(1), 107–115. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00029-9)
- Yao, L., Datta, N., Tomás-Barberán, F. A., Ferreres, F., Martos, I., & Singanusong, R. (2003). Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry*, 81(2), 159–168. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00388-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00388-6)
- 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>
- Zhang, G., & Abdulla, W. (2022). New Zealand honey botanical origin classification with hyperspectral imaging. *Journal of Food Composition and Analysis*, 109, 104511. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104511>
- Zhang, J., Chen, H., Fan, C., Gao, S., Zhang, Z., & Bo, L. (2020). Classification of the botanical and geographical origins of Chinese honey based on 1H NMR profile with chemometrics. *Food Research International*, 137, 109714. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109714>
- 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>