



UNIVERSIDAD DE BURGOS

Facultad de Ciencias

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los

Alimentos

**ESTUDIO DE COMPONENTES
VOLÁTILES, COMPUESTOS
FENÓLICOS Y PROPIEDADES
BIOLÓGICAS EN MIELES DE
CASTILLA Y LEÓN**

TESIS DOCTORAL

Marta Alevia Antón

Burgos, 2022



UNIVERSIDAD DE BURGOS

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Dra. Sandra M^a Osés Gómez, Profesora Contratada Doctor del Área de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Burgos

Dr. Miguel Ángel Fernández Muiño, Catedrático de Universidad del Área de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Burgos

CERTIFICAN QUE:

Dña. Marta Alevia Antón ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Estudios de componentes volátiles, compuestos fenólicos y propiedades biológicas en mieles de Castilla y León”.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos exigidos para ser presentado como Tesis Doctoral y es apta para su defensa, expresan su conformidad con dicha presentación.

Y para que así conste, firman el presente certificado en Burgos a 19 de julio de dos mil veintidós.

Burgos, 19 de julio de 2022

Fdo. Sandra M^a Osés Gómez

Fdo. Miguel Ángel Fernández Muiño

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la implicación profesional y personal de todas las personas que me han acompañado durante este apasionante camino hacia la investigación.

Quiero dar las gracias en primer lugar a mis directores de tesis el Dr. Miguel Ángel Fernández Muíño y la Dra. Sandra Osés Gómez, sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Me han guiado, acompañado y ayudado como lo hacen los verdaderos padres, sin apenas notarse un atisbo de cansancio por el esfuerzo realizado. Han estado ahí siempre, cogiéndome de la mano en mis primeros pasos y dándome la confianza y cariño necesarios para llegar sin desfallecer al final del camino. Miguel, has sido para mí un gran maestro tanto en la parte académica como en la de actitud de vida. Sandra, ser tu primera doctoranda es un privilegio y un regalo que llevaré siempre conmigo. Os voy a echar mucho de menos porque vuestra entrega ha sido un ejemplo a todos los niveles.

Gracias a todos los integrantes del Área de Nutrición y Bromatología en especial a la Dra. M^a Mar Cavia, por ser mi puerta de entrada en esta aventura y tratarme como una “verdadera compañera de clase” en todo momento, a la Dra. M^a Teresa Sancho Ortiz por introducirme en el apasionante mundo de las mieles, por su cercanía y cariño y por demostrarme que con ganas y motivación no hay “semáforos en rojo” que te impidan llegar a la meta, a la Dra. Sara Raquel Alonso de la Torre por su ayuda en todo momento para resolver mis dudas, por su empatía y por esas entrañables conversaciones en las largas jornadas de laboratorio, a la Dra. Celia Carrillo por esa sonrisa que tanta fuerza me ha dado y por ese ventilador en las calurosas tardes de verano que refrescaron mi cuerpo y mi mente, a la Dra. Lourdes Aldea Segura por sus abrazos y cariño en cada encuentro de sus prácticas de laboratorio, a mi compañera Leire Cantero por las horas de protocolos compartidas y a Gonzalo Moreno del que he aprendido el sentido práctico tanto dentro como fuera del laboratorio. En todos vosotros he encontrado un refugio de cariño y habéis sido para mí un espejo de constancia y esfuerzo en el que mirar durante estos años.

Gracias a todos esos apicultores que con su vocación y esfuerzo hacen realidad este apasionante mundo de la apicultura, sin su imprescindible colaboración, no podrían llevarse a cabo estudios de este tipo. También agradecer a las áreas de Tecnología de los Alimentos y Microbiología de la Universidad de Burgos por dejarme utilizar sus instalaciones y equipos.

Gracias a mis amigos por escucharme y animarme siempre, por creer en mí en todo momento y por entender y respetar mis ausencias. Durante este largo tiempo me han demostrado el verdadero sentido de la palabra “amistad”.

Por último, me gustaría agradecer a mi familia todo lo que ha significado su presencia en este proyecto, gran parte de esta tesis también es vuestra. A mi madre que ha alimentado mi cuerpo y mi alma durante todo este proyecto, “gracias mama” por ser mi remanso de paz y

descanso. A mis hermanos y sus familias, que también son la mía, de todos ellos he recibido esas palabras de ánimo y ese impulso necesarios para avanzar. También han estado presentes en todo momento, aunque ya no estén aquí, mi hermano Javi y mi padre, como me gustaría poder compartir con vosotros este momento. Papá, en este camino realizado hay muchas de tus enseñanzas de vida, el esfuerzo diario llevado con alegría, del que tú eras el “gran maestro”, son la esencia de esta tesis.

Dejo para el final a las tres personas que han remado conmigo en todo momento, sin su compromiso nunca podría haber terminado esta tesis. Mis hijos Blas y Darío a los que ha cambiado tanto la vida durante estos años, gracias por demostrarme que siempre es buen momento para hacer realidad los sueños, con vosotros al lado todo es posible. Por último, quiero decir a la persona que más carga ha soportado durante este camino que no encuentro las palabras con que agradecer todo el sacrificio y el esfuerzo realizado. Gracias Blas por tu entrega infinita, por tus renunciaciones y hacer realidad este proyecto. Después de tantas vivencias juntos, sobrevivir a esta tesis demuestra que podemos con todo. Gracias por ser el verdadero compañero de este y de todos los viajes que nos queden por hacer.

“Hijo mío, come la buena miel del panal que sabe dulce, la sabiduría es así de buena para ti.
Si eres sabio tienes esperanza y la esperanza nunca se acaba.”

(Proverbios 24, 13-14)

RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral se ha determinado mediante análisis melisopalinológico, el origen botánico de 30 mieles de la Comunidad Autónoma de Castilla y León (España), dando como resultado que 7 mieles eran de milflores, 5 de viborera (Boraginaceae tipo *Echium* sp.), 5 de brezo (Ericaceae tipo *Erica* sp. y Ericaceae tipo *Calluna vulgaris* (L.) Hull), 3 de trébol (Leguminosae tipo *Trifolium* sp.), 3 de aliaga (Leguminosae tipo *Genista scorpius*), 2 de mielada, 2 de bosque, 1 de cuernecillo (Leguminosae tipo *Lotus* sp.), 1 de zarzamora (Rosaceae tipo *Rubus* sp.) y 1 de castaño (Fagaceae tipo *Castanea sativa* Miller). Sobre las 30 muestras se ha realizado el estudio de los compuestos volátiles y semivolátiles por cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas. Se han detectado 231 compuestos. A pesar del reducido número de muestras de cada origen botánico, se han propuesto posibles marcadores para las mieles de mielada, bosque, brezo, cuernecillo y castaño. El análisis de componentes principales utilizando 22 compuestos ha permitido una correcta separación de las mieles de bosque, brezo, cuernecillo y castaño.

Posteriormente se han seleccionado de esas 30 muestras, 15 mieles (2 de mielada, 2 de bosque, 3 de viborera, 5 de brezo y 3 de aliaga), para analizar mediante HPLC-UV el perfil de los compuestos fenólicos, poniendo de manifiesto que el perfil fenólico varía de una miel a otra independientemente del origen botánico, obteniendo la menor concentración de compuestos fenólicos en las muestras de viborera y la mayor en las de brezo.

Además, se ha investigado el efecto de la extracción química y la digestión *in vitro* de las mieles sobre los compuestos bioactivos (compuestos fenólicos totales y flavonoides) y las actividades biológicas (antioxidante, antimicrobiana y antiinflamatoria), comparando las muestras de miel cruda, los extractos metanólicos y los extractos tras la digestión *in vitro*. La actividad antioxidante se ha evaluado frente a tres radicales (ABTS^{•+}, ROO[•], •OH), y la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*.

En las mieles de brezo se han obtenido los valores más altos de compuestos bioactivos y actividades potencialmente funcionales respecto a las mieles de otros orígenes botánicos. Las muestras de viborera, por lo contrario, mostraron las cantidades más bajas de compuestos bioactivos y actividades potencialmente funcionales. Estos datos son concordantes con los resultados obtenidos en relación al perfil fenólico de las mieles. Los resultados muestran que los extractos metanólicos, frente a las mieles crudas, presentaron valores más bajos de fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante, y antimicrobiana (para todos los microorganismos estudiados excepto *L. monocytogenes*) y mayores actividades antiinflamatorias. La mayor actividad antiinflamatoria indica un posible uso de los extractos de miel en la industria farmacéutica y cosmética. Nuestro trabajo confirma que, tras la digestión gastrointestinal *in vitro*, la miel sigue manteniendo compuestos con actividad antioxidante y antimicrobiana contra *L. monocytogenes* y *S. aureus*.

ÍNDICE

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	3
1. LA MIEL	3
2. ELABORACIÓN Y PROCESADO.....	4
2.1. ELABORACIÓN	5
2.2. PROCESADO	7
3. PRODUCCIÓN DE LA MIEL. DATOS ECONÓMICOS	8
3.1. A NIVEL MUNDIAL	8
3.2. EN LA UNIÓN EUROPEA (UE).....	9
3.3. EN ESPAÑA	11
3.4. EN CASTILLA Y LEÓN.....	12
4. COMPOSICIÓN DE LA MIEL	13
4.1. AZÚCARES	13
4.2. AGUA.....	15
4.3. SUSTANCIAS NITROGENADAS	15
4.4. ÁCIDOS	17
4.5. CENIZAS/ MINERALES.....	17
4.6. VITAMINAS.....	18
4.7. COMPUESTOS FENÓLICOS	18
4.8. COMPUESTOS VOLÁTILES	21
4.9. LÍPIDOS.....	21
4.10. HIDROXIMETILFURFURAL.....	21
4.11. PIGMENTOS.....	22
4.12. COMPUESTOS TÓXICOS	22
5. PROPIEDADES BIOLÓGICAS	23
5.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	24
5.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	26
5.3. ACTIVIDAD ANTINFLAMATORIA	28
5.4. ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA	30
5.5. OTRAS PROPIEDADES.....	31
II. OBJETIVOS.....	37
III. MUESTRAS Y PLAN DE TRABAJO.....	41
1. MUESTRAS DE MIEL	41
2. ANÁLISIS MELISOPALINOLÓGICO.....	41
2.1. REACTIVOS	41
2.2. MATERIALES.....	41
2.3. PROCEDIMIENTO.....	41
3. SELECCIÓN DE MUESTRAS PARA EL ESTUDIO DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y PROPIEDADES BIOLÓGICAS.....	43
IV. RESULTADOS	45
IV.I. ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES Y SEMIVOLÁTILES EN MIELES DE CASTILLA Y LEÓN.....	47
1. INTERES DE LOS AROMAS EN LA MIEL Y MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	47

2. OBJETIVO	50
3. MATERIAL Y MÉTODOS	50
3.1. MUESTRAS	50
3.2. REACTIVOS Y MATERIALES.....	50
3.3. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES Y SEMIVOLÁTILES.....	51
3.4. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	53
3.5. ANÁLISIS CUALI-CUANTITATIVO DE COMPUESTOS VOLÁTILES Y SEMIVOLÁTILES	54
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	54
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
4.1. COMPUESTOS ALIFÁTICOS	71
4.2. DERIVADOS DEL BENCENO	74
4.3. COMPUESTOS DERIVADOS DEL CALENTAMIENTO Y ENVEJECIMIENTO	78
4.4. NORISOPRENOIDES	79
4.5. COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS	80
4.6. TERPENOIDES	80
4.7. FLAVONOIDES Y COMPUESTOS RELACIONADOS	81
4.8. COMPUESTOS POLICÍCLICOS	82
4.9. COMPUESTOS DESCONOCIDOS	82
4.10. POSIBLES MARCADORES.....	83
4.11. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES	84
5. CONCLUSIONES	86
<i>IV.II. COMPUESTOS FENÓLICOS Y PROPIEDADES FUNCIONALES DE LA MIEL.....</i>	<i>89</i>
<i>IV.II.1. COMPUESTOS FENÓLICOS DE LAS MIELES.....</i>	<i>89</i>
1. PROCESOS DE EXTRACCIÓN Y TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE FENOLES.....	89
2. OBJETIVO	91
3. MATERIAL Y MÉTODOS	91
3.1. MUESTRAS	91
3.2. REACTIVOS Y MATERIAL	91
3.3. EXTRACCIÓN	92
3.4. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.....	93
3.5. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....	94
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	96
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	97
4.1. VALIDACIÓN DEL METODO ANALÍTICO.....	97
4.2. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL PERFIL FENÓLICO.....	98
4.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES	103
5. CONCLUSIONES	104
<i>IV.II.2. INFLUENCIA DE DISTINTOS PROCESOS DE EXTRACCIÓN EN LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LA MIEL.....</i>	<i>105</i>
1. PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN LA MIEL.....	105
1.1. EXTRACCIÓN QUÍMICA	105
1.2. EXTRACCIÓN FISIOLÓGICA-DIGESTION.....	105
1.3. MÉTODO DIRECTO-SIN EXTRACCIÓN (QUENCHER).....	111
2. OBJETIVO	112
3. MATERIAL Y MÉTODOS	112

3.1.	MUESTRAS	112
3.2.	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	112
3.3.	FENOLES Y FLAVONOIDES	114
3.4.	PROPIEDADES BIOLÓGICAS.....	115
3.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	125
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	125
4.1.	FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES	125
4.2.	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	128
4.3.	ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.....	131
4.4.	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	131
4.5.	ÁNÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.....	136
5.	CONCLUSIONES.....	137
V.	CONCLUSIONES GENERALES	141
VI.	BIBLIOGRAFIA.....	145
ANEXO I	169

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Colmenas modelo Langstroth.....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 2 y 3. Desoperculación y decantación</i>	<i>7</i>
<i>Figura 4. Producción mundial de miel (Tn) de 2010 a 2019</i>	<i>8</i>
<i>Figura 5. Principales países de producción de miel en 2020 (Tn)</i>	<i>9</i>
<i>Figura 6. Producción mundial por continentes de 2010 a 2019</i>	<i>9</i>
<i>Figura 7. Porcentaje de importaciones por continentes 2014-2019.....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 8. Explotaciones apícolas por comunidades autónomas en 2020.....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 9. Exportaciones de España hacia la UE en 2020 (Tn).....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 10. Porcentaje de colmenas por comunidad autónoma en 2021.....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 11. Derivados del ácido benzoico C6-C1.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 12. Derivados del ácido cinámico C6-C3.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 13. Núcleo básico de los flavonoides.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 14. Clasificación de flavonoides.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 15. Esquema de control de la presión arterial.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 16. Esquema de parámetros evaluados en las distintas muestras.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 17. Esquema del protocolo de extracción de compuestos volátiles y semivolátiles.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 18. Rotavapor Büchi R-124.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 19. Cromatógrafo de gases HP 6890 Hewlett Packard con inyector Split/Splitless.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 20. Cromatograma de una miel de mielada. Muestra M1.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 21. Cromatograma de una miel de boque. Muestra BQ1</i>	<i>59</i>
<i>Figura 22. Cromatograma de una miel de viborera. Muestra V2.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 23. Cromatograma de una miel de brezo. Muestra BR2</i>	<i>61</i>
<i>Figura 24. Cromatograma de una miel de aliaga. Muestra A2.....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 25. Cromatograma de una miel de milflores. Muestra ML4</i>	<i>57</i>
<i>Figura 26. Cromatograma de una miel de trebol. Muestra T1.....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 27. Cromatograma de una miel de cuernecillo. Muestra C1</i>	<i>60</i>
<i>Figura 28. Cromatograma de una miel de zarzamora. Muestra Z1</i>	<i>56</i>
<i>Figura 29. Cromatograma de una miel de castaño. Muestra CS1.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 30. Gráfica tiempo de retención de los distintos alcanos.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 31. Gráfica tiempo de retención de los distintos alquenos.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 32. Gráfica tiempo de retención de las distintas cetonas.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 33. Análisis de componentes principales de las 30 muestras de miel en función de los 22 compuestos volátiles seleccionados.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 34. Cartuchos Strata-X SPE y sistema Manifold para extracción</i>	<i>92</i>
<i>Figura 35. Cromatógrafo de líquidos Varian Pro Star 310 con detector UV.....</i>	<i>94</i>

<i>Figura 36. Cromatograma de la mezcla patrón de compuestos fenólicos 0,1 mg/ml con identificación de los picos.....</i>	<i>95</i>
<i>Figura 37. Análisis de componentes principales de las mieles según los compuestos fenólicos.....</i>	<i>103</i>
<i>Figura 38. Espectrofotómetro Varian UV-Visib</i>	<i>115</i>
<i>Figura 39. Fluorímetro Lector de microplacas Varioskan LUX</i>	<i>118</i>
<i>Figura 40. Ejemplo de la representación de la fluorescencia de las muestras para el cálculo del área bajo la curva.</i>	<i>120</i>
<i>Figura 41. Esquema de la placa de 96 pocillos para evaluar la actividad antimicrobiana.</i>	<i>123</i>
<i>Figura 42. Reacción de Morgan-Elson de acuerdo con Muckenschnabel et al. (1998).....</i>	<i>124</i>
<i>Figura 43. Fenoles totales expresados como mg de ácido gálico (GA)/100 g de miel de mieles crudas (RH), extractos metanólicos (ME) y extracto digestivo (DH).....</i>	<i>127</i>
<i>Figura 44. Flavonoides totales expresados como mg de catequina (Ct)/100 g de miel de mieles crudas (RH), extractos metanólicos (ME) y extracto digestivo (DH).....</i>	<i>128</i>
<i>Figura 45. Actividad antioxidante de las mieles crudas (RH), los extractos metanólicos (ME) y el extracto digestivo (DH) contra diferentes radicales (ABTS^{••+} (A), ROO[•](B) y [•]OH (C)).</i>	<i>130</i>
<i>Figura 46. Actividad antiinflamatoria de las mieles crudas (RH), los extractos metanólicos (ME) y el extracto digestivo (DH)</i>	<i>131</i>
<i>Figura 47. Análisis de componentes principales de las 15 mieles RH, ME y DH en función de fenoles totales, flavonoides totales, actividad antioxidante y actividad antiinflamatoria</i>	<i>137</i>

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Nivel de abundancia y frecuencia relativa de los principales tipos de polen en varias mieles monoflorales.....</i>	<i>3</i>
<i>Tabla 2. Cuadro-Resumen de composición de la miel</i>	<i>14</i>
<i>Tabla 3. Origen botánico de las 30 muestras de miel analizadas melisopalinológicamente</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 4. Listado de las 15 muestras seleccionadas para realizar el estudio de compuestos fenólicos y actividad biológica.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabla 5. Grupos de compuestos volátiles y semivolátiles representados por colores</i>	<i>54</i>
<i>Tabla 6. Compuestos volátiles y semivolátiles encontrados en las 30 muestras de miel</i>	<i>65</i>
<i>Tabla 7. Máximas concentraciones de hidrocarburos de alto peso molecular.....</i>	<i>73</i>
<i>Tabla 8. Compuestos volátiles y semivolátiles seleccionados para el análisis de componentes principales</i>	<i>86</i>
<i>Tabla 9. Condiciones de la fase móvil en gradiente de HPLC para el análisis de compuestos fenólicos en las mieles</i>	<i>93</i>
<i>Tabla 10. Tiempo de retención (minutos), R₂, Límite de cuantificación y Límite de detección (mg/ml) de los 10 patrones de compuestos fenólicos</i>	<i>97</i>
<i>Tabla 11. Valores de repetibilidad, reproductibilidad y recuperación del análisis de compuestos fenólicos mediante HPLC</i>	<i>98</i>
<i>Tabla 12. Contenido en compuestos fenólicos (mg /100 g de miel) de las 15 mieles analizadas mediante HPLC</i>	<i>99</i>
<i>Tabla 13. Valores máximos y mínimos de concentración media de compuestos fenólicos de las mieles según su origen botánico.....</i>	<i>102</i>
<i>Tabla 14. Revisión de diferentes procesos de digestión in vitro realizados en la miel (modificación de Adrian, 2020).....</i>	<i>108</i>
<i>Tabla 15. Cantidad de reactivo añadido a cada pocillo en la microplaca para el análisis del ORAC..</i>	<i>119</i>
<i>Tabla 16. Concentración mínima de inhibición (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) de las mieles crudas (RH), de los extractos metanólicos de miel (ME) y de la miel después de la digestión in vitro (DH), expresadas como % de miel, extracto o fracción digestiva y, entre paréntesis, la correspondiente concentración de miel (g/100 ml)</i>	<i>133</i>

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. LA MIEL

La legislación define la miel como “*una sustancia natural dulce producida por la abeja *Apis mellifera* a partir del néctar de plantas o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores presentes en las partes vivas de plantas, que las abejas recolectan, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que madure*” (DOCE, 2002; BOE, 2003). Este producto con importantes cualidades nutricionales es consumido desde hace miles de años por los humanos.

La miel puede clasificarse según su origen en los siguientes tipos:

a) Miel de flores o miel de néctar: es la miel que procede del néctar de las plantas. Si predomina el néctar de un solo tipo de especie vegetal (polen predominante generalmente con una frecuencia mayor del 45%), se denomina miel monofloral y si en su composición se encuentra el néctar de varias especies vegetales, sin que predomine ninguno, se denomina miel multifloral. El porcentaje de polen para que una miel sea definida como monofloral varía según el origen botánico. Existen excepciones para especies vegetales en las que el polen puede aparecer infra o suprarrepresentado, como se refleja en la Tabla 1 (Von der Ohe et al., 2004).

Tabla 1. Nivel de abundancia y frecuencia relativa de los principales tipos de polen en varias mieles monoflorales (Von der Ohe et al., 2004)

POLEN INFRARREPRESENTADO	POLEN QUE PUEDE ESTAR INFRARREPRESENTADO	POLEN NORMALMENTE REPRESENTADO	POLEN SUPRARREPRESENTADO
<i>Arbutus</i> (8–20%)	<i>Calluna</i> (10–77%)	<i>Erica</i> (> 45%)	<i>Castanea</i> (> 86%)
<i>Carduus</i> (5–25%)	<i>Helianthus</i> (12–92%)	<i>Eryobotrya</i> (> 45%)	<i>Eucalyptus</i> (> 83%)
<i>Citrus</i> (2–42%)	<i>Rhododendron</i> (15–77%)	<i>Hedysarum</i> (> 50%)	<i>Brassica napus</i> (> 60%)
<i>Lavandula latifolia</i> (15–42%)	<i>Robinia</i> (7–60%)		<i>Phacelia</i> (> 60%)
<i>Lavandula × intermedia</i> (1–20%)	<i>Rosmarinus</i> (10–57%)		
<i>Medicago</i> (1–10%)	<i>Thymus</i> (13–68%)		
<i>Taraxacum</i> (5–40%)	<i>Tilia</i> (1–56%)		

b) Miel de mielada: es la miel que procede en su mayor parte de excreciones de insectos chupadores de plantas (hemípteros) presentes en las partes vivas de las plantas o de secreciones de las partes vivas de las plantas.

c) Miel de bosque: Es la mezcla de miel de flores y mielada

También puede clasificarse atendiendo a su destino en:

a) Miel para consumo directo: es la miel que tiene las características de color, sabor y frescura adecuados y aceptables para el mercado de consumo directo.

b) Miel para utilización en la industria (miel para uso industrial): es la miel que, por sus características de color, sabor u otras características, no es aceptable para el paladar del consumidor final. Es la miel apropiada para usos industriales o para su utilización como ingrediente de otros productos alimenticios que puede:

- a) presentar un sabor o un olor extraños, o
- b) haber comenzado a fermentar o haber fermentado, o
- c) haberse sobrecalentado.

Otras formas de clasificar las mieles son atendiendo a su elaboración (miel prensada, miel escurrida, miel centrifugada, miel filtrada) a su forma de presentación (miel, miel en panales o miel en secciones, miel cristalizada o granulada, miel con trozos de panal o miel cremosa).

La miel es el edulcorante más antiguo que se conoce, siendo muy apreciada y ampliamente utilizada en la alimentación, en farmacia y cosmética. Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria a la miel se le considera un alimento seguro por su baja actividad de agua, bajo pH y presencia de sustancia antimicrobianas (Fattori 2004).

2. ELABORACIÓN Y PROCESADO

La recolección de la miel, es una de las actividades más antiguas que se conocen, existen testimonios de su uso en el Paleolítico y en grandes culturas antiguas como la egipcia, la china, o la persa entre otras. En todas se pueden encontrar datos y procesos sobre la práctica de la apicultura y el uso de los productos de la colmena (Visquert, 2015). Los primeros apicultores se limitaban a recoger los enjambres que colgaban de las matas o de las ramas de los árboles y los colocaban dentro de las colmenas, para poder recoger posteriormente sus productos (Benedetti y Pieralli, 1990). A mediados del siglo XIX, se produjo un cambio revolucionario en la apicultura, al introducir L. Langstroth (1855, EEUU) el panal en cuadro móvil (Figura 1). Este sistema favoreció una recolección de miel mucho más sencilla, pues se sacaban los cuadros y se podía extraer su contenido sin deteriorar los panales. Con estas colmenas el rendimiento de producción de miel era mucho mayor que el obtenido anteriormente.

L. Langstroth descubrió además que en el interior de la colmena es necesario respetar una distancia de 8 mm entre los panales para permitir el paso libre de las abejas. Si esta distancia es menor las abejas rellenan con propóleos el espacio entre los cuadros. Las dimensiones que dio a sus cuadros y panales continúan siendo la base del diseño de la mayoría de los tipos de colmenas y sus procedimientos los que se siguen en la actualidad.



Figura 1. Colmenas modelo Langstroth

2.1. ELABORACIÓN

El néctar y los mielatos constituyen la materia prima del alimento energético de las abejas. La sacarosa y el agua son los principales compuestos presentes tanto en el néctar como en los mielatos. Durante la elaboración de la miel se realiza un proceso de deshidratación de néctar y miel hasta valores inferiores al 20% y se transforma enzimáticamente la sacarosa obteniendo otros azúcares principalmente glucosa y fructosa (Belitz et al., 2009).

La elaboración de la miel se realiza en cuatro etapas:

RECOLECCIÓN

Las abejas melíferas recogen el néctar o la mielada y lo almacenan en el buche melario para ser transportado a la colmena. Este buche o estómago melífero está separado del intestino medio, donde se digiere la comida, por el proventrículo, una válvula que regula el paso del alimento desde el buche al intestino y retiene el líquido recogido en el buche mientras es transportado a la colmena. En el trayecto, gracias a este proventrículo que poseen las abejas, se filtran las partículas sólidas que contiene la sustancia ingerida, enviándola al intestino. Así, las sustancias recolectadas no entran en contacto con los jugos gástricos de la abeja. En la cabeza y en el tórax de las abejas hay varias glándulas fundamentales para transformar el néctar o la mielada en miel, son las glándulas cefálicas, mandibulares, torácicas e hipofaríngeas. Estas glándulas segregan enzimas (invertasa, diastasa o glucosa oxidasa entre otras) y serán las encargadas de la transformación de la sacarosa en los azúcares presentes finalmente en la miel. Durante el trayecto a la colmena, la carga que transporta la abeja en su buche recorre varias veces el trayecto del buche a la faringe. En este proceso, además, comienza la deshidratación del néctar o mielada con la absorción de una parte del

agua por las células de la pared del buche, pasando después a la hemolinfa, desde donde es evacuado por las células de Malpighi.

AIREACIÓN DEL CONTENIDO DEL BUCHE MELARIO

Esta segunda etapa se realiza en la colmena y se desarrolla en dos fases, una activa, en la que solo participan las abejas receptoras y otra pasiva en la que participan todas las abejas de la colmena.

En la fase activa al llegar la abeja a la colmena regurgita las gotas de néctar y la desliza a través de su lengua estirada aumentando así la superficie de evaporación. Si el flujo del néctar o mielato no es muy abundante, la gotita pasa a una tercera abeja pudiéndose transmitir entre varias. Las gotas de néctar se van evaporando por acción del aire caliente y además se produce la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa, así como otras transformaciones enzimáticas por acción de enzimas presentes en los productos de partida o incorporadas por las abejas. Las abejas absorben y traspasan las gotas de “néctar transformado” o “miel en formación” de modo rápido y continuado hasta obtener un producto con un porcentaje de humedad del 30 al 40% (Mauricio, 1975). Este proceso de aireación se va haciendo cada vez más difícil de realizar por el aumento de la viscosidad del líquido. En este momento comienza la fase pasiva de la maduración, cuando se deposita la gota en una celdilla y las abejas realizan una intensa ventilación sobre los panales.

ALMACENAMIENTO DE LA MIEL

La miel formada es depositada en las celdillas de la colmena y continúa el proceso de deshidratación gracias a la aireación provocada por las abejas (de Luis Villota, 1999). En esta fase la evaporación es indirecta ya que está causada por las intensas corrientes de aire que ocurren en el interior de la colmena, sobre todo durante la noche. En este proceso influye la población de la colmena, el origen del néctar, el contenido en agua de la materia prima, el llenado de las celdillas y los factores climáticos.

La maduración de la miel seguirá de uno a tres días en los que el porcentaje de humedad sigue disminuyendo hasta valores inferiores al 20%. Además del proceso de hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa, se forman diversos oligosacáridos al generarse nuevos enlaces glicosídicos por la acción de las enzimas (Belitz et al., 2009). La transformación nunca es completa, quedando una cantidad remanente de sacarosa.

OPERCULADO DE LA MIEL MADURA

Una vez que la miel tiene un porcentaje de humedad adecuada, las abejas proceden a cerrar los panales con láminas de cera u opérculos para proteger el alimento del aire y de posibles contaminaciones y evitar la captación de agua. Una vez operculada, está lista para ser recogida por el apicultor ya que se puede considerar que el producto obtenido es miel.

2.2. PROCESADO

El momento adecuado para la obtención de la miel es a los pocos días de terminar la floración dominante de la zona de pecoreo. Cuando la miel está suficientemente madura con al menos un tercio de los panales operculados se retiran los panales usando un ahumador, para expulsar a las abejas y evitar su ataque. Es muy importante que el apicultor no coseche por completo toda la miel y deje una cantidad adecuada en el panal para que las abejas puedan alimentarse y continuar sus funciones con normalidad (Alvarez-Suarez, 2009). Antes de proceder a su extracción, es necesario calcular el grado de humedad de la miel, procurando que sea inferior al 18% para evitar futuras fermentaciones. La temperatura no debe superar los 38 °C si se quiere que la miel mantenga sus características organolépticas (Piana et al., 1989). El procesado de la miel comienza con la **desoperculación** de los panales para la extracción de la miel (Figura 2).

La **extracción** puede realizarse por decantación, prensado o centrifugación, y va en ocasiones acompañada de un calentamiento moderado para facilitar el proceso. La centrifugación es el procedimiento más habitual, ya que es rápido, los panales no se deterioran y además se obtiene un mayor rendimiento (Suarez et al., 2009; Ruíz-Navajas, 2011; Visquert et al., 2015). En este proceso, la fuerza centrífuga hace que la miel salga de las celdas, atraviese una tela metálica y vaya a un recipiente donde se recoge por gravedad.



Figura 2. Desoperculación



Figura 3. Decantación

Finalmente se filtra y se decanta (Figura 3) para eliminar burbujas de aire ocluidas, restos de cera, abejas y otras impurezas (Díaz-Moreno, 2009; Ruíz, 2011). Se debe evitar que la filtración sea excesiva y se retire de la miel una cantidad significativa de polen o elementos de mielada que puedan indicar el origen de este alimento. Finalmente, la miel se envasa y etiqueta según legislación pertinente (BOE, 2003; DOCE, 2014; BOE, 2020). La cera de los opérculos se funde y reutiliza y los panales vacíos se colocan de nuevo en las colmenas.

3. PRODUCCIÓN DE LA MIEL. DATOS ECONÓMICOS

3.1. A NIVEL MUNDIAL

La producción mundial de miel ha ido incrementándose a través del tiempo, este crecimiento se mantuvo sobre una línea de tendencia hasta 1991, desde este año hasta 2010 experimentó una caída y a partir de ese año se puede observar un crecimiento no lineal de la producción (Figura 4) (Woller, 2021).

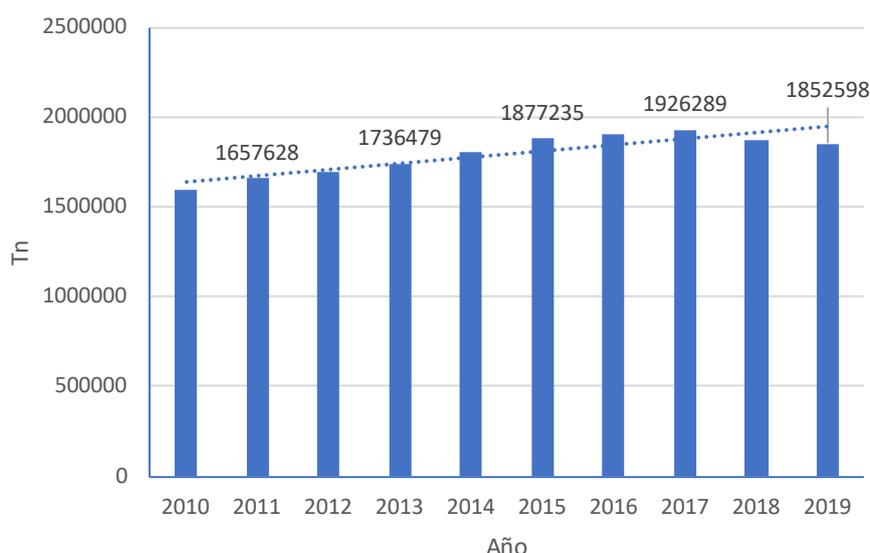


Figura 4. Producción mundial de miel (Tn) de 2010 a 2019 (Woller, 2021)

En la Figura 5 se reflejan los principales países productores de miel a nivel mundial, por volumen de producción, en toneladas métricas, durante 2020. China encabezó la clasificación mundial registrando un volumen superior a las 458.000 toneladas en producción de miel mientras que Turquía e Irán se situaron en segunda y tercera posición, respectivamente (Statista, 2022). En la Figura 6 se representa gráficamente la producción mundial durante 2010-2019 distribuida por regiones, siendo Asia la de mayor volumen con el 45 %, seguida de Europa con el 22 % y muy cerca, América con 21 %; por último, África y Oceanía con 10% y 2 % respectivamente (Woller, 2021).

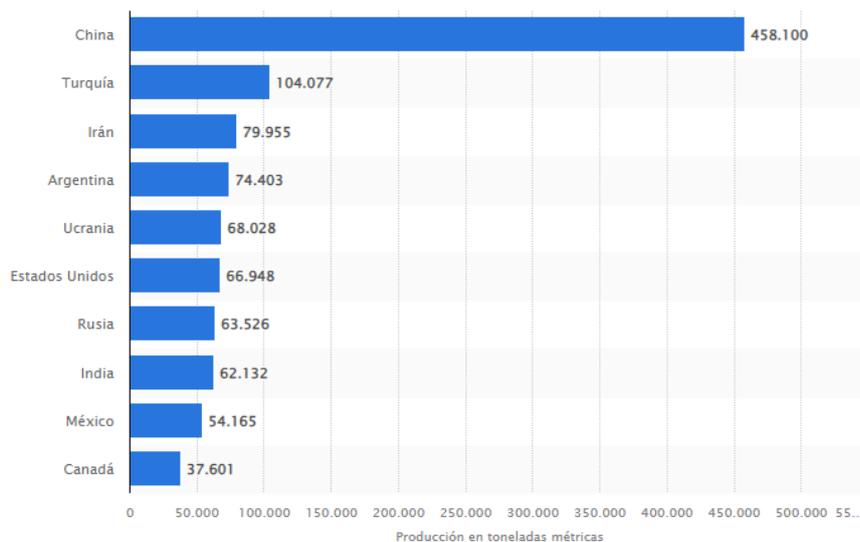


Figura 5. Principales países de producción de miel en 2020 (Tn) (Statista, 2022)

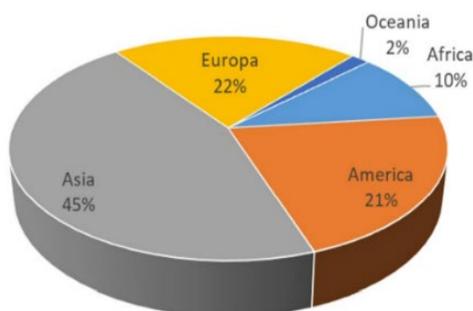


Figura 6. Producción mundial por continentes de 2010 a 2019 (Woller, 2021)

3.2. EN LA UNIÓN EUROPEA (UE)

El sector apícola es clave para mantener los cultivos y la biodiversidad debido al fundamental papel polinizador de las abejas. Asimismo, contribuye desarrollo rural y al asentamiento de población en zonas despobladas. Por ello es considerado un sector clave en la Unión Europea (UE), cuya política agraria trata de minimizar el impacto negativo del uso de plaguicidas u otras prácticas agrícolas sobre las poblaciones de polinizadores. Además, desde 1997 se han desarrollado diversos planes y reglamentos en la UE en apoyo del sector apícola tratando de mejorar tanto las condiciones de producción como de comercialización de la miel y de otros productos apícolas como la jalea real, el polen, los propóleos y la cera de abejas. A pesar de ello los apicultores europeos deben enfrentarse a problemas graves como el aumento de los costes de producción, la enorme competencia en el mercado mundial de grandes países productores como China o Argentina y la preocupante pérdida de colmenas debido a los plaguicidas, el cambio climático o la aparición de nuevos patógenos y enemigos de las abejas como el avispon asiático (Sobrino, 2020).

La Comisión Europea cifra en 2020 un total de 615.058 apicultores en la UE y 18.9 millones de colmenas, lo que supone un ascenso del 3,9% en comparación con la campaña anterior. Se ubican en su mayoría en el sur de la UE: España, Francia, Grecia, Rumanía e Italia. El número de apicultores de la UE ha incrementado un 8,2 % respecto a la campaña anterior, aunque es algo inferior a las campañas previas (Comisión europea, 2021). Tan solo el 5,2 % de los apicultores de la UE tienen más de 150 colmenas y pueden ser clasificados como apicultores “profesionales” (Subdirección General de producciones ganaderas y cinegéticas, 2021). En Alemania el promedio de colmenas por explotación es de 7 colmenas, 27 en Francia e Italia, elevándose a 80 en Rumania y hasta 103 en España (Comisión europea, 2021). En 2020 en la EU había un total de 18.927.000 colmenas, siendo España la de mayor número (2.967.000) seguido de Rumania (2.247000) (Comisión europea, 2021).

La UE es el segundo productor mundial de miel después de China con una producción anual de 280.000 Tn. A pesar de ello esta producción tan sólo cubre un 60% de la demanda interior con lo que la UE es un importador neto de miel situándose como el primer importador de miel a nivel mundial. En los últimos años se ha ido aumentando lentamente la producción en Rumanía, España, Hungría, Alemania e Italia, pero este aumento sigue siendo claramente insuficiente para cubrir la demanda en el consumo interior de la UE (Comisión europea, 2019). En la Figura 7 se representa gráficamente la distribución de las importaciones durante el periodo 2014-2019 siendo Europa, como hemos indicado anteriormente el mayor importador con el 51 % y un promedio anual de 333.546 Tn, seguido de América con el 29 % con 191.140 Tn promedio anual, y Asia con el 17 % y 109.611 Tn promedio anual, seguido de África y Oceanía con 2 % (11.152 Tn) y 1 % (7.774 Tn) respectivamente (Woller, 2021).

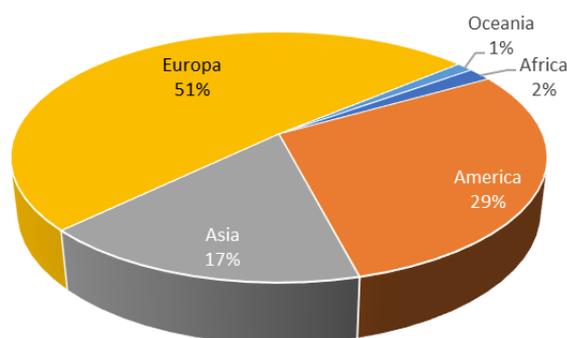


Figura 7. Porcentaje de importaciones por continentes 2014-2019 (Woller,2021)

Dentro de la EU los países con mayor volumen de importación durante el periodo 2014-2020 fueron Alemania, Francia y España importando principalmente de Ucrania, China y Argentina (Comisión europea, 2021; Woller, 2021).

Europa no solo compra miel, también la vende fuera de sus fronteras, aunque las exportaciones fuera de la UE son insignificantes. Solamente unas 31.086 Tn de miel fueron

exportadas en 2020, ante la demanda de miel de alta calidad, a países como Reino Unido, Suiza, Arabia Saudí, Japón, y Estados Unidos, siendo España y Alemania los principales países exportadores de la UE (Comisión europea, 2021; Subdirección General de producciones ganaderas y cinegéticas, 2021).

3.3. EN ESPAÑA

España es el primer productor de miel de la Unión Europea (UE), con un volumen anual de más de 30.000 Tn, gracias a sus tres millones de colmenas y sus 35.300 apicultores. En la Figura 8 se representa el número de explotaciones apícolas por comunidad autónoma y el porcentaje de apicultores profesionales. El porcentaje de profesionalización en España es del 18%, el más alto de la UE. El número de explotaciones apícolas en España ha aumentado en torno al 47% en el periodo 2010/2021 (Subdirección General de producciones ganaderas y cinegéticas, 2021).

Al igual que el resto de la UE, España importa miel. En 2020 China redujo sus volúmenes de exportación a España, pasando a ser Portugal el principal proveedor, seguido de Uruguay y ocupando China la tercera posición. Otros exportadores relevantes fueron Argentina, Ucrania y Polonia (Subdirección General de producciones ganaderas y cinegéticas, 2021). En 2021, Rumanía pasó a ser el principal país abastecedor de miel en España (Agronews, 2021). La fuerte bajada registrada en las importaciones procedentes de China en 2020 y 2021 se debe a cambios estratégicos realizados por los importadores españoles de miel para adaptarse a la entrada en vigor del Real Decreto 523/2020 de modificación de la norma de calidad de la miel. La aspiración de este real decreto es implantar un etiquetado más detallado mencionando el país o los países de origen en los que la miel, y en sus casos, sus mezclas fueron recolectadas.

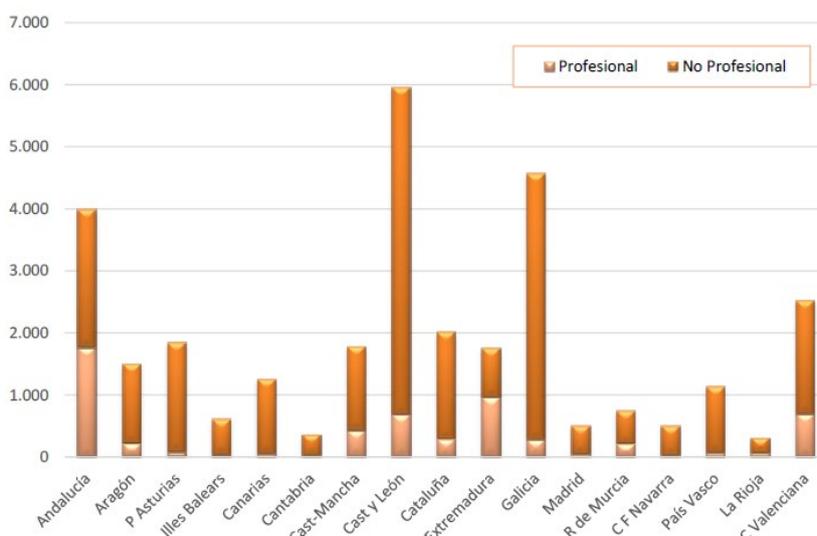


Figura 8. Explotaciones apícolas por comunidades autónomas en 2020 (Subdirección General de producciones ganaderas y cinegéticas, 2021)

Por otro lado, las exportaciones de miel en España han ido creciendo hasta consolidarse en el mercado exterior como una línea de comercialización con entidad propia. En cuanto a los destinos del comercio exterior de miel, destacaron en 2020, Francia, Alemania, Italia y Portugal (Figura 9). Como países extracomunitarios destacaron Arabia Saudí, EEUU, Israel y Marruecos, pero con escaso peso comparado con los movimientos dentro de la comunidad (Subdirección General de producciones ganaderas y cinegéticas, 2021).

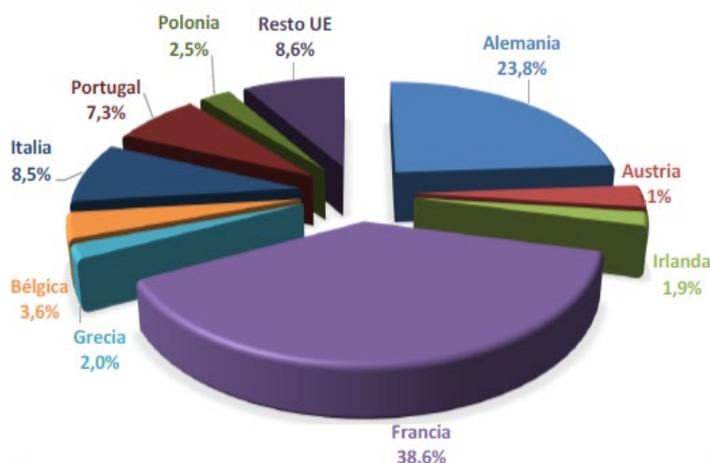


Figura 9. Exportaciones de España hacia la UE en 2020 (Tn) (Subdirección General de producciones ganaderas y cinegéticas, 2021)

3.4. EN CASTILLA Y LEÓN

La mayor producción de miel, que concentra más del 70% del total de la producción en España, se sitúa en 4 Comunidades Autónomas, coincidiendo con las CCAA con mayor censo de colmenas. El porcentaje de este censo se refleja en la Figura 10: Extremadura (22 %), Andalucía (21,1%), Castilla y León (15,8%) y Comunidad Valenciana (11%). En Castilla y León en 2021 hay más de 5.600 apicultores que agrupan casi 445.000 colmenas, lo que supone casi ese 16 % de las colmenas del total nacional (Junta de Castilla y León, 2021).

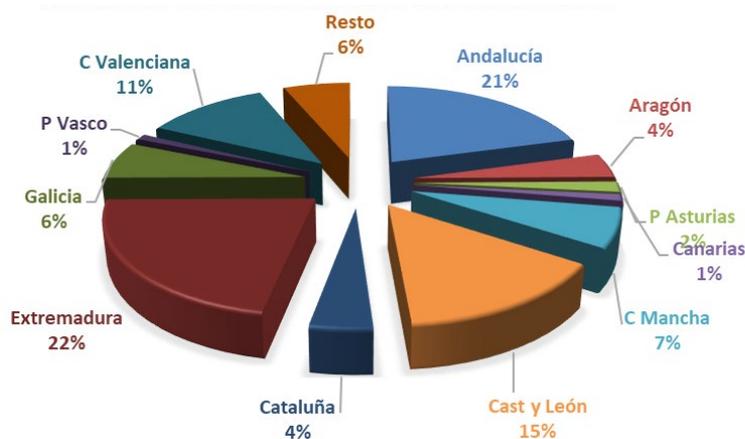


Figura 10. Porcentaje de colmenas por comunidad autónoma en 2021 (Subdirección General de producciones ganaderas y cinegéticas, 2021)

4. COMPOSICIÓN DE LA MIEL

La composición de la miel varía dependiendo de sus orígenes botánico y geográfico, de las condiciones climáticas, del estado de la colmena y del procesado y conservación de la misma (Escriche et al., 2017). Principalmente la miel es una solución acuosa concentrada de fructosa y glucosa que contiene además una mezcla compleja de otros hidratos de carbono en cantidades muy inferiores y de otros compuestos minoritarios. Los hidratos de carbono suponen aproximadamente el 80% de la materia total y el 95-99% de la materia seca (Visquert, 2015), y son responsables del sabor dulce de la miel y de su elevado poder calórico. Entre los componentes minoritarios de la miel destacan diversos enzimas, ácidos orgánicos, proteínas, minerales, aminoácidos, sustancias aromáticas, pigmentos, ceras, y granos de polen (Belitz et al., 2014). En la Tabla 2 se pueden observar valores medios de la composición media de este alimento.

4.1. AZÚCARES

Los azúcares constituyen más del 95% de la materia seca de la miel, y son los responsables de muchas de sus propiedades como su viscosidad, higroscopicidad, tendencia a la granulación y valor energético. Algunos azúcares proceden del néctar o del mielato, pero otros derivan de la acción de las enzimas segregadas por las abejas durante el proceso de maduración. Con el envejecimiento de la miel el perfil de azúcares sufre modificaciones, en general los polisacáridos aumentan y los monosacáridos disminuyen. Este aumento de polisacáridos ocurre tanto por la acción enzimática como por la acción de los ácidos debido al pH de la miel (Sanz et al., 2002).

Los azúcares mayoritarios en la miel son fructosa y glucosa representando el 85% de los azúcares totales. En la mayoría de las mieles predomina la fructosa, excepto en mieles de *Trichostema lanceolatum* (hierba de vinagre), *Taraxacum officinale* (diente de león), y *Brassica napus* (colza) que contienen más glucosa que fructosa. Al poseer la fructosa un mayor poder edulcorante que la glucosa, las mieles más ricas en fructosa como la miel de acacia presentan sabores más dulces mientras que las de mayor contenido en glucosa como la miel de colza tienen un sabor menos dulce (Bogdanov et al., 2008).

Entre el 5 y el 15% de los carbohidratos de la miel son disacáridos, trisacáridos, tetrasacáridos (de los que se han identificado unos 25 compuestos diferentes) además de algunos oligosacáridos.

Entre los disacáridos destacan la maltosa, sacarosa, isomaltosa y nigerosa (Fattori, 2004). La maltosa es el disacárido más abundante seguido de la sacarosa. El contenido de sacarosa varía mucho de unas mieles a otras y en la legislación se contempla como un buen indicador de la maduración de la miel ya que, cuando aparece en cantidades elevadas evidencia la

Tabla 2. Cuadro-Resumen de composición de la miel (Adrian, 2020)

COMPUESTOS	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
Azúcares	60-85% Mayoritarios: fructosa y glucosa. Sacarosa, maltosa, trisacáridos como rafinosa y melecitosa.	(Sousa et al., 2016; Bogdanov, 2017a; Živkov Baloš et al., 2020)
Agua	13-20% Valor óptimo 15-17%	(Machado De-Melo et al., 2018)
Sustancias nitrogenadas	0,7% En su mayoría enzimas: invertasa, glucosa-oxidasa, diastasa Aminoácidos: prolina	(Bogdanov, 2017a; Machado De-Melo et al., 2018)
Ácidos	0,5% Ácidos orgánicos: ácido glucónico. En menor cantidad acético, cítrico, oxálico, entre otros.	(Mato et al., 2004; Ananias et al., 2013; Bogdanov, 2017a)
Cenizas	0,02-0,3% miel de flores; 1% en mielada. El más importante: K (80%) seguido de Na, Mg y Ca. Elementos traza: Al, Cl, fosfatos, sulfatos.	(Anklam, 1998; Felsner et al., 2004; Fernández-Torres et al., 2005; Bogdanov, 2017a; Machado De-Melo et al., 2018)
Vitaminas	Trazas Vitamina C. También contiene vitaminas del grupo B.	(García Pérez, 2003; León-Ruiz et al., 2013; Machado De-Melo et al., 2018)
Compuestos fenólicos	0,5-1,3% Principales responsables de la actividad antioxidante. Mieles más oscuras mayor contenido en polifenoles.	(Andrade et al., 1997; Beretta et al., 2005; Bogdanov, 2017a; Chen et al., 2000; Ferreira et al., 2009; Gheldof et al., 2002; Becerril-Sánchez et al., 2021)
Compuestos volátiles	Trazas Responsables del aroma: Terpenos, aldehídos, cetonas, alcoholes, entre otros.	(Castro-Vázquez et al., 2003; Bogdanov, 2017a)
Lípidos	0,04% Esteroles, fosfolípidos, glicéridos. Ácidos grasos: esteárico, palmítico, linoleico, entre otros.	(Machado De-Melo et al., 2018)
HMF	Parámetro de frescura. Legislación.	(DOCE, 2002; Bogdanov, 2017a)
Pigmentos	Trazas Responsables del color: Antocianinas, carotenoides, fenoles y xantofilas	(Alqarni et al., 2016)

inmadurez de la miel o bien su adulteración con melazas. En la legislación vigente el contenido de sacarosa no debe ser superior a 5 g/100g de miel (BOE, 2003). En algunas mieles como las de *Robinia pseudoacacia* (Falsa acacia), *Medicago sativa* (alfalfa), *Banksia menziesii* (banksia de Menzies) *Hedysarum sp.* (zulla), *Eucalyptus camadulensis* (eucalipto rojo), *Eucryphia lucida*, *eucryphia milliganii* (árbol del cuero) o *Citrus sp.* (limonero, naranjo, mandarino) el límite legal es 10 g/100g de miel y para la miel de *Lavandula sp.* (Lavanda, espliego, cantueso) y *Borago officinalis* (borraja) de 15 g/100g de miel.

Los trisacáridos son grupos complejos de azúcares que se encuentran en concentraciones muy pequeñas, se han identificado entre otros la melicitosa y erlosa (formadas por el mecanismo de transglucosidación entre glucosa y sacarosa) y la rafinosa. La melicitosa se ha identificado en porcentajes importantes en mieles de mielada. La erlosa tiene una función importante en la caracterización de mieles de romero y la rafinosa se considera un excelente marcador en la caracterización de mieles de bosque, destacando su presencia en mieles de mielada de pino (Juan et al., 1992).

Los oligosacáridos presentes en la miel son sintetizados por la acción transglucosilasa y transfructosilasa de los enzimas presentes en la miel durante la lisis de la sacarosa.

4.2. AGUA

El contenido de agua de la miel depende de los numerosos factores como el clima, la humedad ambiental, el origen botánico y geográfico, las prácticas apícolas, entre otros (León-Ruiz 2013). La legislación española permite que el contenido en agua de una miel madura sea de hasta un 20%; en miel de brezo «*Calluna*» y miel para uso industrial en general, no superior al 23% y en miel de brezo «*Calluna vulgaris*» para uso industrial, inferior al 25% (BOE, 2003). La legislación establece estos límites porque con valores superiores la miel es susceptible de sufrir fermentación y no ser apta para el consumo humano. El proceso de fermentación está vinculado a la relación existente entre el contenido en agua, la temperatura y la concentración de levaduras osmófilas presentes en la miel. Por lo general, cuando la humedad es inferior al 17%, la miel no fermenta (en el periodo de un año), sea cual sea el contenido de levaduras osmófilas. En el caso de la miel de «*Calluna vulgaris*», el límite permitido es superior (23%) porque contiene una sustancia gelatinosa de naturaleza proteica que provoca mayor retención de agua, sin que exista peligro de fermentación.

4.3. SUSTANCIAS NITROGENADAS

La miel contiene en torno al 0,7% de componentes nitrogenados, principalmente en forma de proteínas, enzimas y aminoácidos libres.

El contenido proteico procede del néctar o del mielato, del polen y de las propias abejas. La mayoría de estas proteínas son enzimas. Las mieles que proceden de plantas con mucha cantidad de polen tienen mayor porcentaje proteico (mieles de castaño o viborera), ya que el

polen de las plantas está compuesto principalmente por proteínas. También hay mieles bajas en proteínas como las de acacia, azahar y tilo (García Pérez 2003).

Las **proteínas** influyen en la tensión superficial y son responsables de la capacidad de formación de espuma de ciertas mieles, como la miel de alforfón (*Fagopyrum esculentum*). Algunas de las proteínas encontradas en la miel son albúminas, globulinas y peptonas.

El contenido de **aminoácidos libres** en miel es pequeño, encontrándose los valores más altos en las mieles de mielada. Los aminoácidos pueden provenir tanto de origen animal (secreciones de las abejas), como de origen vegetal (néctar, mielato y polen). Además de las cantidades, las proporciones de los aminoácidos dependerán del origen de la miel (néctar o mielato). La prolina, que procede de las secreciones salivares de la abeja, es el aminoácido mayoritario representando como mínimo el 50 % de los aminoácidos de la miel. La prolina podría utilizarse como posible indicador de maduración o de adulteración de la miel puesto que valores anormalmente bajos pueden indicar que la miel ha sido recogida inmadura o que las abejas han sido alimentadas con azúcar comercial en tanto que valores muy altos pueden indicar la adulteración de la miel con colágeno (White y Rudyj, 1978).

En la miel, además de prolina se han encontrado otros 26 aminoácidos libres entre los que destacan la lisina, la fenilalanina, la tirosina, el ácido glutámico y el ácido aspártico. Al ser el polen la mayor fuente de aminoácidos en la miel, el perfil de aminoácidos podría ser utilizado como marcador del origen botánico e incluso geográfico de la miel (Cometto et al., 2003).

Como se ha indicado anteriormente muchas proteínas de la miel poseen actividad enzimática, Estas enzimas, que son fundamentales para la transformación del néctar o mielatos en miel, provienen de los jugos salivares y secreciones faríngeas de la abeja obrera, aunque también pueden tener su origen en la savia de las plantas, en el polen, en los insectos productores de mielatos o en microorganismos presentes en la miel. La presencia de enzimas es una característica que diferencia a la miel de otros edulcorantes, son termolábiles y su actividad disminuye con el paso del tiempo, por eso su presencia es indicadora de calidad en la miel. Las tres enzimas más importantes de la miel son:

Diastasa (o α -amilasa), procede tanto de la abeja como del néctar. Descompone el almidón (la sustancia de reserva más abundante del reino vegetal, aunque no es muy frecuente en néctar), los oligo y polisacáridos, en pequeñas unidades de azúcares simples (Ortiz Valbuena et al., 1996). Es la enzima más resistente al calor y por ello se utiliza como indicador de frescura, existiendo un límite mínimo de diastasas en la legislación (BOE, 2003).

Invertasa (también conocida como sacarasa o α -glucosidasa), es responsable de la hidrólisis de la sacarosa del néctar o de los mielatos en fructosa y glucosa, siendo la máxima responsable de los cambios que ocurren en los procesos de formación y durante la maduración de la miel. Se produce en las glándulas hipofaríngeas de las abejas. Esta enzima posee acción transglucosilasa, produciéndose en los pasos intermedios de esta reacción

varios oligosacáridos, entre los que destacan la erlosa y la maltosa. Es una enzima muy termolábil (Cavia, 2002) por esta razón podría utilizarse como indicador de frescura y envejecimiento de la miel.

Glucosa oxidasa, se produce en las glándulas faríngeas de las abejas para transformar la glucosa en ácido glucónico y también produce gluconolactona que está en equilibrio con el ácido glucónico. Esta enzima es responsable de la formación de peróxido de hidrógeno, que es uno de los principales compuestos responsables de la actividad antibacteriana de la miel. La glucosa-oxidasa puede ser utilizada como indicador de calidad por su labilidad, ya que su reducción o ausencia se pueden relacionar con alteraciones que haya sufrido el producto como por ejemplo un calentamiento excesivo, adulteración o envejecimiento de la miel (Ortiz Valbuena, 1992). Es más sensible al calor que las dos anteriores, inactivándose totalmente a 60°C.

Otras enzimas que podemos encontrar en la miel son la catalasa, la ácido fosfatasa, la β -glucosidasa y diversas proteasas.

4.4. ÁCIDOS

Los ácidos orgánicos presentes en la miel contribuyen a su sabor, aportando una ligera acidez, y son responsables, en parte, de la resistencia de la miel frente al ataque de microorganismos. Los ácidos en la miel se encuentran en un porcentaje muy bajo, aproximadamente del 0,5%. Se hallan como ácidos libres y también como lactonas (reserva potencial de acidez, cuando la miel se alcaliniza). El ácido glucónico, formado a partir de la glucosa, es el más abundante, se encuentra en equilibrio con la gluconolactona, se produce por acción de la glucosa-oxidasa sobre la glucosa, es por ello que durante la maduración de la miel aumenta su acidez (Tosi et al., 2000; Cavia, et al., 2007).

En la miel además de glucónico están presentes otros ácidos como el fórmico o el oxálico cuyo origen es fundamentalmente animal y otros como el los ácidos succínico, málico, maleico, butírico, cítrico o acético de origen vegetal (Ortiz Valbuena, 1992). Se ha demostrado que el contenido de estos ácidos varía según el origen de la miel. Todos ellos se disocian en solución acuosa liberando al medio iones hidrógeno. La concentración de estos iones se determina midiendo el pH, que en la miel oscila entre 3,4 y 6,4 aproximadamente.

4.5. CENIZAS/ MINERALES

Su contenido es bajo y varía notablemente en función del origen botánico, el manejo del apicultor, las técnicas de extracción, las condiciones del suelo, y las climáticas. El mineral más abundante en mieles es el potasio que representa hasta un 80% de los minerales. En mucha menor proporción se han encontrado otros minerales entre los que destacan Ca, Na, Fe, P, Mg, Zn, Cu y Mn (De Lorenzo, 2002).

Algunos investigadores consideran que no existe una evidencia clara que permita relacionar minerales y origen botánico, si bien las mieles de mielada poseen un contenido en minerales entorno al 1% superior al de las mieles de néctar que poseen valores alrededor del 0,2%. Lo

que si se ha podido establecer en una relación del contenido en algunos minerales con el origen geográfico de la miel (Anklam, 1998).

Las cenizas de la miel se han usado tradicionalmente como parámetro de la cantidad de minerales. Actualmente se evalúan a través de la conductividad eléctrica de la miel disuelta en agua, debido a que es una técnica más rápida, precisa y barata (Acquarone et al., 2007).

4.6. VITAMINAS

Las vitaminas presentes en la miel proceden del polen y de otras partes de la planta de origen, pero se encuentran en niveles tan bajos que no tienen importancia nutricional. Los grupos vitamínicos más importantes son los hidrosolubles (vitamina C y del grupo B); también se han detectado vitaminas A, D y E, pero de forma más esporádica (Horn, 1996).

El contenido de vitaminas en la miel filtrada disminuye de forma considerable, hasta un 45% (excepto la vitamina K), debido a la pérdida de polen. La oxidación del ácido ascórbico por el peróxido de hidrógeno producido por la glucosa oxidasa supone asimismo importantes pérdidas de Vitamina C. Existen pocas investigaciones publicadas sobre vitaminas en mieles debido a los bajos niveles y la inestabilidad de estos compuestos.

4.7. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los polifenoles son compuestos orgánicos que poseen uno o más anillos aromáticos y grupos hidroxilos unidos a él (Bogdanov et al., 2004). Son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de éstas ya que se encuentran en casi todos los alimentos de origen vegetal. Son metabolitos secundarios, relativamente polares y tienden a ser solubles en agua. Proviene del néctar o de secreciones de las plantas, por ello su estudio puede ser útil para la clasificación botánica de las mieles (Escriche et al., 2014; Tanleque-Alberto et al., 2020).

Los criterios para clasificar estos compuestos no están claramente definidos, una forma de hacerlo es, según su estructura, diferenciándose dos grandes grupos (Gómez Romero, 2010).

ÁCIDOS FENÓLICOS

Estos compuestos tienen una función carboxílica y un grupo hidroxílico fenólico, derivan del ácido benzoico (ácido vanílico, ácido gálico o ácido siríngico) y del ácido cinámico (ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido sináptico, ácido p-cumarico o ácido elálgico). Su estructura química puede verse en las Figuras 11 y 12 respectivamente (Valdez Palomino 2014).

Los ácidos fenólicos tienen gran importancia debido a su amplia actividad biológica ya que poseen propiedades antioxidantes, antivirales, antitumorales, antifúngicas, antimutagénicas, hepatoprotectoras y antiinflamatorias (Valdez Palomino, 2014).



Figura 11. Derivados del ácido benzoico C6-C1 (Valdez Palomino, 2014)

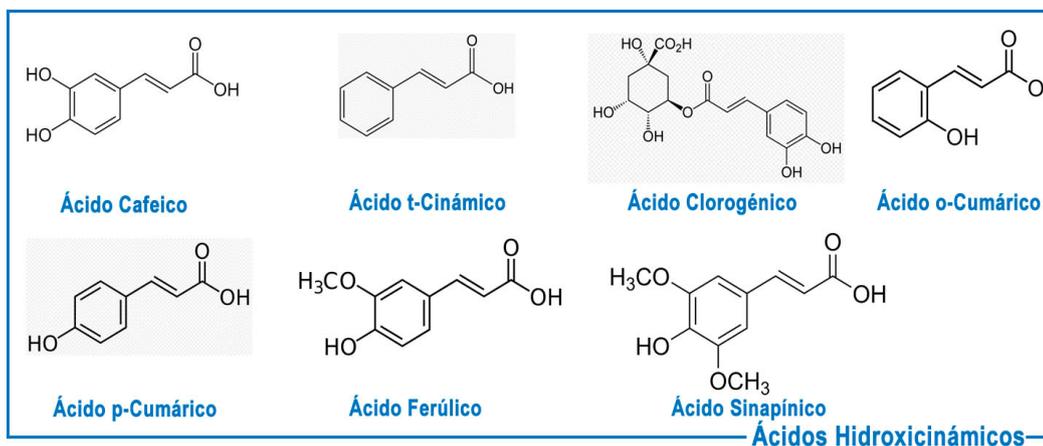


Figura 12. Derivados del ácido cinámico C6-C3 (Valdez Palomino, 2014)

FLAVONOIDES

Los flavonoides son sintetizados en cantidades substanciales por las plantas y comprenden alrededor de 4000 compuestos identificados. Se encuentran, sobre todo, en las partes de la planta más expuestas al sol, como hojas, frutos y flores, ya que la luz solar favorece su síntesis. Estos compuestos son importantes para la planta, al igual que ocurre con la mayor parte de metabolitos secundarios, porque además de ser responsables de la coloración de muchas flores, frutos y hojas, intervienen en la polinización atrayendo a los insectos. Aunque su presencia en la miel es muy baja, encontrándose de forma más abundante en las mieles oscuras, son compuestos muy importantes por su contribución en las propiedades antioxidantes (Gheldof et al., 2002; Bogdanov et al., 2008; Oroian y Escriche, 2015; Tanleque-Alberto y Escriche, 2020).

Se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general C6-C3-C6, pueden formar o no un tercer anillo. En la Figura 13 se representa el núcleo básico de los flavonoides (Valdez Palomino 2014).

Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 1 al 8 y los del anillo B desde el 1' al 6'. Poseen un carbonilo en posición 4 y las variaciones se producen en las posiciones 1, 2 y 3 de la unidad C y en el anillo B. Estos compuestos se clasifican en función del estado de oxidación del anillo heterocíclico (anillo C) y de la posición del anillo B. Dentro de cada familia existe una gran variedad de compuestos diferentes entre sí según el número y la posición de los grupos hidroxilos, y por los distintos grupos funcionales que pueden presentar (metilos, azúcares, ácidos orgánicos) (Quiñones et al., 2012).

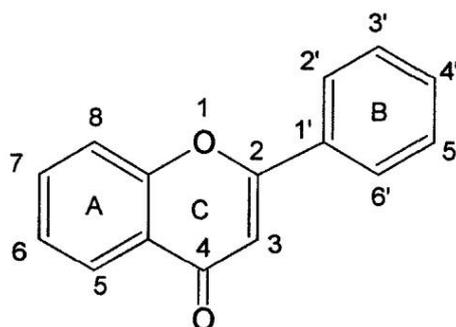


Figura 13. Núcleo básico de los flavonoides (Valdez Palomino, 2014)

En la Figura 14 se muestra la subdivisión de los flavonoides en 13 clases (Valdez Palomino 2014).

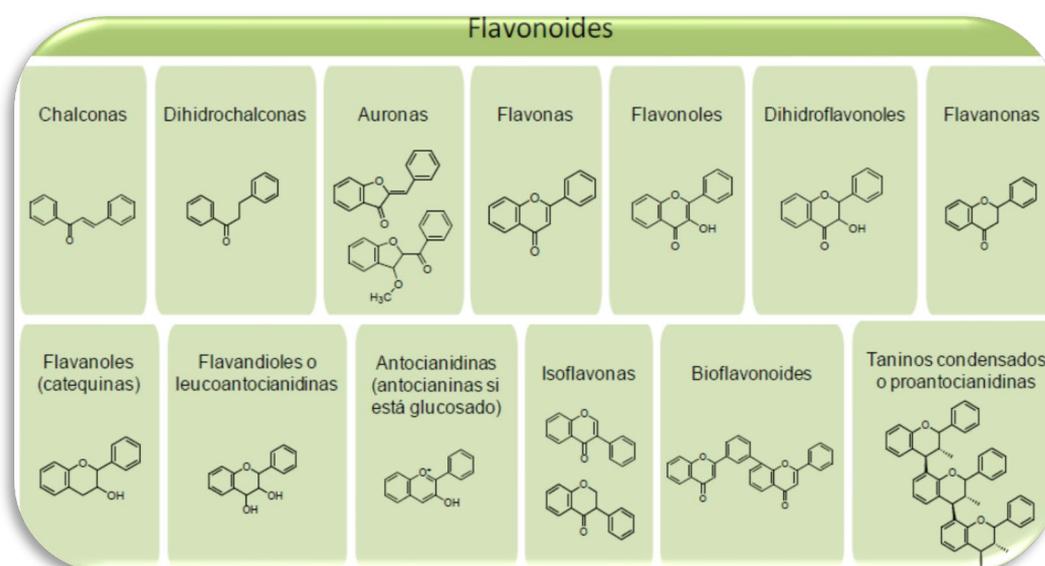


Figura 14. Clasificación de flavonoides (Gómez Romero, 2010)

Dentro del grupo de los flavonoides propiamente dichos, los más destacables por su interés farmacológico son las flavonas y los flavonoles. Como puede verse en la Figura 14, las flavonas, tienen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3 y los flavonoles, contienen un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo OH en posición 3 del anillo C (Martínez-Flórez et al., 2002).

Dentro de las flavonas el componente más representativo es la luteína y de los flavonoles la quercetina, que es el flavonol amarillo del polen de muchas fagáceas (*Quercus* sp.) (García y Zavaleta, 2009); su distribución y su concentración pueden ser distintas incluso en la misma planta (Quiñones et al., 2012).

Los flavonoides se encuentran sobre todo como glucósidos, pero también pueden aparecer en forma libre (llamados agliconas flavonoides). Otras formas en las que pueden presentarse son como sulfatos, dímeros o polímeros. Los glucósidos se pueden encontrar de dos formas: como O-glucósidos con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace

hemiacetal), o como C-glucósidos con los carbohidratos ligados a través de enlaces carbono-carbono. De todas estas formas naturales, los O-glucósidos son los mayoritarios (Quiñones et al., 2012).

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos con grandes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición. Esta acción antioxidante de los flavonoides depende principalmente de su capacidad de quelar metales y de reducir radicales libres, impidiendo las reacciones catalizadoras de los radicales libres. Desempeñan un papel fundamental en la protección frente al daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías (López Luengo, 2002).

4.8. COMPUESTOS VOLÁTILES

El aroma de la miel se atribuye a varios compuestos químicos volátiles de bajo peso molecular que proceden directamente de las flores visitadas por las abejas, se originan a partir de componentes vegetales mediante la generación directa de compuestos aromáticos por las abejas, así como la termogeneración de compuestos aromáticos y la acción de microorganismos (Serra y Ventura, 2003; Baroni et al., 2006).

Los componentes de la fracción volátil son relativamente complejos, ya que se presentan a muy bajas concentraciones y con escasa estabilidad química. Su concentración se puede alterar por un calentamiento excesivo o a una inadecuada conservación de las mieles (Visquert, 2015).

Los principales compuestos volátiles de la miel aparecen como mezclas complejas de diferentes estructuras químicas como terpenoides, norisoprenoides, compuestos alifáticos, derivados de benceno y compuestos cíclicos. Sus diferentes concentraciones y la existencia de algunos compuestos específicos de ciertos orígenes, otorgan a las mieles matices aromáticos que permiten su diferenciación (Zhou et al., 2002; Alissandrakis et al., 2003; Bastos y Alves, 2003).

El perfil aromático de la miel, junto con la identificación de marcadores químicos volátiles, ha demostrado ser eficaz en la determinación del origen botánico y geográfico de la miel, así como en la detección de posibles adulteraciones (Cuevas-Glory et al., 2007).

4.9. LÍPIDOS

Los lípidos de la miel provienen, principalmente, de las plantas y de los restos de cera y tan solo constituyen el 0,04% de la miel. Entre los lípidos presentes en la miel aparecen glicéridos, esteroides, fosfolípidos y ácidos grasos como el ácido láurico, el pentadecanoico, el palmítico y el oleico (Sáenz y Gómez, 2000; Sabatini, 2007).

4.10. HIDROXIMETILFURFURAL

El hidroximetilfurfural (HMF) es un aldehído cíclico que se forma en las mieles a temperatura ambiente a partir de deshidratación de la fructosa en medio ácido. Se encuentra en mieles

frescas, aunque en pequeñas cantidades. Su presencia suele indicar una pérdida de frescura y calidad en la miel. El calentamiento acelera su aparición. La normativa actual (BOE, 2003), permite un contenido no superior a 40 mg/kg de HMF. En el caso de mieles de origen declarado procedente de regiones de clima tropical y mezclas de estas mieles se permite una cantidad no superior a 80 mg/kg.

La concentración de HMF está en relación directa con el grado de calentamiento al que ha sido sometida la miel y con su grado de envejecimiento (Fallico et al., 2004).

Normalmente, en la miel recién cosechada no existe HMF, ya que esta miel proviene de un néctar recientemente segregado por las plantas y es depositada por las abejas en los panales. Durante el procesado, con el objetivo de fluidificar la miel, algunos apicultores someten a la miel a una serie de calentamientos que retrasan su cristalización y evitan posibles fermentaciones, pero provocan un aumento del contenido de HMF.

El aumento de hidroximetilfurfural depende sobre todo de la relación existente entre la temperatura de calentamiento y el tiempo que dura este calentamiento, por eso es tan importante controlar las diferentes etapas desde que la miel es recolectada hasta que llega a sus puntos de venta. Una vez la miel es envasada, el aumento de HMF va a depender de las condiciones de almacenamiento.

En definitiva, tanto el paso del tiempo como la temperatura son factores que afectan decisivamente en el deterioro de las propiedades beneficiosas de la miel. El HMF es el parámetro que normalmente se usa para evaluar la pérdida de calidad de la miel, pero no existe una regla definida que permita conocer como aumenta este parámetro al someter las mieles a unas condiciones determinadas.

Por último, cabe señalar, que el hidroximetilfurfural es una sustancia que en los niveles legalmente permitidos en la miel no supone ningún riesgo para la salud humana, si bien a concentraciones muy superiores puede incluso llegar a ser tóxico (Guadalix et al., 2002).

4.11. PIGMENTOS

Los pigmentos se encuentran en muy baja cantidad, pero tienen gran importancia al influir de modo decisivo en la coloración de la miel que es una característica importante por su relación con el origen botánico y también por afectar a la aceptabilidad por parte de los consumidores (Visquert, 2015). Podemos clasificar los pigmentos en dos grupos según su solubilidad: liposolubles como los carotenoides, e hidrosolubles, como algunos polifenólicos que por oxidación dan compuestos oscuros. En las mieles oscuras predominan los pigmentos hidrosolubles y en las claras los liposolubles (Díaz-Moreno, 2009).

4.12. COMPUESTOS TÓXICOS

Algunas mieles pueden contener en su composición compuestos tóxicos sintetizados por las plantas o insectos, como alcaloides pirrolizidínicos o contaminantes como pesticidas y antibióticos (Kempf et al., 2008; Lucchetti et al., 2016). Los principales compuestos tóxicos que han aparecido en algunas mieles son los alcaloides de pirrolizidina e hidrocarburos

cíclicos polihidroxiados (diterpenoides), conocidos como grayanotoxinas (Islam et al., 2014; Johnson, 2015). Los alcaloides de pirrolizidina de las mieles pueden convertirse en un importante riesgo para la salud sobre todo por sus efectos hepatotóxicos, se han identificado alrededor de 600 estructuras diferentes (Oplatowska et al., 2014), que aparecen en dos formas principalmente; bases terciarias y sus correspondientes N-óxidos (Beales et al., 2004). Las grayanotoxinas tienen una importancia menor ya que se dan en menor número de mieles (fundamentalmente mieles de *Rhododendron*) y sus efectos son menos graves.

Otros compuestos tóxicos de la miel son los hidrocarburos aromáticos policíclicos que están presentes en los contaminantes ambientales orgánicos y que pueden ser agentes mutágenos y/o cancerígenos. Estos compuestos se forman en los procesos industriales y actividades humanas (como el refinamiento del petróleo, la metalurgia, las calefacciones o emisiones de automóviles) y también aparecen en procesos de combustión natural (como erupciones volcánicas o incendios forestales) (Dobrinas et al., 2008; Cierniak et al., 2013; Iwegbue et al., 2016). Dobrinas et al. (2008) mostraron que la miel producida en montaña y zonas rurales estaba menos contaminada que la miel de zonas urbanas. Otros posibles contaminantes cuyos niveles hay que controlar en mieles son los plaguicidas y los antibióticos.

5. PROPIEDADES BIOLÓGICAS

La miel es una extraordinaria fuente de energía, posee altos valores nutricionales (330 kcal/100gr), presenta carbohidratos de rápida absorción (El-Arab et al., 2006) y es el único concentrado de azúcares presente en casi cualquier parte del mundo (Krell, 1996). Debido a su composición química tiene importantes propiedades biológicas, entre las que destacan las antioxidantes, antibacterianas y antiinflamatorias. Su uso se remonta a hace miles de años ya que la apicultura data del Neolítico (entre 6000 y 2500 años a.C), con los inicios de la agricultura. Los registros escritos más antiguos en papiros y tablas de arcilla demuestran claramente que los egipcios usaban la miel como medicina antes de 1900 a 1250 a.C en trastornos digestivos y en ungüentos para llagas y heridas. Esta civilización además usaba la miel en las ceremonias de embalsamamiento y la depositaban en las tumbas de los faraones, costumbre que desveló su gran capacidad de conservación. El científico y filósofo Aristóteles (384-322 a.C.) consideró la miel como un buen ungüento para los ojos y las heridas, mientras que Dioscórides (50 d.C.) describió la miel como efectiva para todas las úlceras podridas y huecas, quemaduras solares, tos e inflamación de la garganta y las amígdalas (Otero-Salinas, 2018). Los antiguos griegos usaban la miel para tratar la fatiga y sus atletas utilizaban una mezcla de miel y agua antes de los eventos atléticos más importantes. Los antiguos chinos, griegos, egipcios, asirios y romanos también usaban la miel para tratar heridas e infecciones intestinales (Ball, 2007). Los romanos, además de usarlo como único edulcorante conocido, descubrieron su utilidad como conservante alimentario (García Pérez, 2003). La miel ha ocupado un lugar importante en la medicina tradicional durante siglos (Vit et al., 2015). Durante la última década, diversas investigaciones sobre la miel, han confirmado sus

diferentes propiedades, tales como antioxidantes, antiinflamatorias, antibacterianas, antivirales, antiulcerosas, antihiperlipidémicas, antidiabéticas y anticancerígenas (Viuda-Martos et al., 2008; Pichichero et al., 2009).

En la actualidad se emplea en numerosos procesos, como en el tratamiento de enfermedades de garganta, asma, desórdenes gastrointestinales, heridas infectadas y crónicas, úlceras de piel y cataratas, entre otros (Basson y Globber 2008). Los datos obtenidos en el Laboratorio de Nutrición Deportiva y Ejercicio de la universidad de Memphis mostraron que la miel se puede utilizar de forma eficaz, en lugar de la glucosa, para la reposición de energía durante el ejercicio físico, sugiriendo que la miel es el mejor sustituto de la glucosa. Por lo tanto, la miel se ha descrito como un alimento bien tolerado y una fuente eficaz de carbohidratos para los atletas (Ajibola et al., 2012). Con respecto al índice glucémico, si se compara con la sacarosa, la miel es una opción de comida más saludable (Al-Khalidi et al., 1980). El principal monosacárido de la miel es la fructosa que tiene un índice glucémico de 19, frente al de la sacarosa que es de 68 (Bogdanov, 2017b). Arcot y Brand-Miller (2005) observaron una correlación negativa entre el índice glucémico de la miel y la concentración de fructosa, por lo que las mieles ricas en fructosa podrían ser beneficiosas en el control más estricto del aumento de glucosa en sangre de pacientes diabéticos (Jenkins et al., 2002). La miel también contiene sustancias saludables como colina y acetilcolina. La colina desempeña un papel fundamental en las enfermedades cardiovasculares y función cerebral, así como en la composición y reparación de la membrana celular, la acetilcolina funciona como un neurotransmisor (Bogdanov, 2017b).

La ingesta de miel también puede presentar efectos adversos en determinadas situaciones, por un lado, el potencial alergénico de algunos compuestos de las abejas o proteínas vegetales presentes en la miel (Simón et al., 2009), y por otro el riesgo a que la miel presente esporas de la bacteria *Clostridium botulinum*. Se recomienda no dar miel de abeja ni sus derivados a niños menores de un año, ya que estas esporas al llegar al intestino del bebé pueden germinar y liberar la toxina botulínica (Brown, 2000; Manyi-Loh et al., 2011), sin embargo, no existe ningún riesgo en la ingesta de miel por parte de humanos mayores de 12 meses (Bogdanov, 2017b).

5.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La oxidación es una reacción bioquímica en cadena que produce radicales libres que pueden dañar las células, los tejidos y, en última instancia, las funciones fisiológicas (Otero-Salinas, 2018). Los compuestos antioxidantes tienen la facilidad de ceder de forma casi espontánea, un electrón, desactivando los radicales libres. Cuando encuentran un radical libre, detienen la reacción en cadena, el radical libre se estabiliza dejando de generar radicales libres y el antioxidante se oxida convirtiéndose en una sustancia inocua (León-Ruiz, 2013). Actualmente el interés se ha centrado en los antioxidantes dietéticos por su efecto protector contra el daño oxidativo. Los antioxidantes tienen una amplia variedad de actividades bioquímicas, que incluyen la inhibición de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno,

la captación directa o indirecta de radicales libres y la alteración de potencial redox intracelular (Carvajal, 2019).

Los compuestos antioxidantes actúan como protectores de enfermedades en los seres vivos al neutralizar oxidantes y radicales libres, de modo que previenen daños moleculares en los lípidos de las membranas celulares, proteínas y ácidos nucleicos (Schramm et al., 2003). Especial interés tienen las especies reactivas del oxígeno como el anión superóxido, el radical peróxido o el radical hidroxilo, que pueden ser generadas en el medio ambiente o como consecuencia del metabolismo celular y que pueden provocar daños celulares relacionados con fenómenos de mutagénesis, cáncer, envejecimiento o arteriosclerosis.

Numerosos estudios evidencian el potencial antioxidante de la miel por la cantidad de compuestos antioxidantes que posee en concentraciones similares al de frutas y hortalizas (Chen et al., 2000; Gheldof et al., 2002; Schramm et al., 2003). Los principales antioxidantes presentes en la miel son: ácidos fenólicos (ácido benzoico y ácido cinámico), flavonoides (flavonoles, flavonas y flavonones), ácidos orgánicos (ácido oxálico, glucónico, málico y cítrico), algunas enzimas (glucosa oxidasa, catalasa, etc.), productos de la reacción de Maillard, ácido ascórbico, péptidos y proteínas. Los efectos antioxidantes de estos compuestos no solo se ejercen a nivel individual, sino que se han observado efectos sinérgicos (Gheldof et al., 2002; Khalil et al., 2012; Perna et al., 2013).

La cantidad de flavonoides presentes en la miel depende de su origen botánico (Gheldof et al., 2002). Las mieles más oscuras y turbias como las de brezo, castaño o mielada generalmente presentan mayor contenido en sustancias antioxidantes que las claras y transparentes como las de acacia, romero, espliego o azahar. Esta diferencia se debe sobre todo a la mayor cantidad de compuestos fenólicos en las mieles oscuras (Chen et al., 2000; Taormina et al., 2001; Kesić et al., 2009; Alvarez-Suarez et al., 2009; Cimpoiu et al., 2013; Meo et al., 2017). También se ha visto que las condiciones y el tiempo de almacenamiento tienen efecto sobre la capacidad antioxidante de la miel, existiendo estudios que hablan de un aumento de la actividad antioxidante con el tiempo de almacenamiento, y en cambio otros que dicen que disminuye (Braghini et al., 2020; Turkmen et al., 2006).

En varios estudios se ha revisado la importancia del uso de la miel como agente protector en situaciones de daño hepático, radiación, inflamación y otras patologías relacionadas con estrés oxidativo (Boukraâ, 2014; Bogdanov, 2017b) ya que, por su actividad antioxidante, la miel podría jugar un importante papel en el manejo de enfermedades crónicas asociadas al estrés oxidativo (Erejuwa et al., 2011; Erejuwa et al., 2012; Boukraâ, 2014). El estrés oxidativo es una de las principales causas de neuro inflamación, que conduce a la apoptosis y muerte neuronal. En los procesos neurodegenerativos, la miel puede tener una actividad significativa contra la hipoperfusión cerebral crónica, uno de los factores que contribuyen a la enfermedad de Alzheimer (Goes et al., 2017).

Relacionado con la actividad antioxidante de la miel, existen estudios que aseguran que su ingesta inhibe la oxidación de lipoproteínas séricas humanas (Gheldof et al., 2002; Schramm et al., 2003). Además, se ha determinado que el papel de los compuestos fenólicos de la miel

en las membranas de los glóbulos rojos humanos limita el daño oxidativo por la asimilación en la membrana celular y su capacidad de entrar y alcanzar el citosol. Se concluye con esto que la miel contiene antioxidantes necesarios para la actividad biológica, la defensa y el aumento de las funciones de los glóbulos rojos (Alvarez-Suarez et al., 2009). Estas afirmaciones han sido corroboradas a través de estudios de biodisponibilidad de antioxidantes en las células, tejidos y órganos en estudios *in vivo*. Se ha comprobado un aumento de la actividad antioxidante en plasma tras la ingestión de miel, con la consiguiente inactivación de especies reactivas de oxígeno (ROS) presentes en la sangre y evitando así los efectos adversos de su llegada a las células. En este sentido numerosos autores promueven la sustitución de los edulcorantes tradicionales por miel (Schramm et al., 2003).

Por otra parte, en varios artículos se estudia el empleo de la miel para evitar y retrasar el deterioro de los alimentos debido a las reacciones oxidativas, protegiendo a frutas y hortalizas del pardeamiento oxidativo y a las carnes de oxidaciones lipídicas. En uno de esos estudios se investigó el efecto de dos concentraciones diferentes (1,0 % y 1,5 %) de miel de abeja sin aguijón de Malasia para recubrir papayas durante el almacenamiento. El recubrimiento con 1,5 % de esa miel tuvo un gran potencial para retrasar el proceso de maduración durante el almacenamiento de la fruta (Maringgal et al., 2020). Półtorak et al. (2019) realizaron un estudio para examinar la influencia de los componentes bioactivos de la miel multifloral sobre la calidad y características sensoriales de los embutidos. Las salchichas a las que se añadieron componentes bioactivos presentaron mayores propiedades antioxidantes, mayores valores de fenoles totales y mayor actividad antiinflamatoria. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó el nivel más alto de compuestos bioactivos. En otro estudio se demostró que la miel multifloral mejora los efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antimicrobianos de los embutidos almacenados (Półtorak et al., 2018), concluyendo que la miel es un antioxidante natural útil para la conservación de los alimentos.

5.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

El uso de la miel como medicina se remonta a tiempos inmemoriales, aunque fue en 1982 cuando se describió su actividad antimicrobiana por primera vez. El avance de los antibióticos en la medicina occidental desplazó la aplicación de la miel a un segundo plano. Desde hace un par de décadas se ha redescubierto como tratamiento para úlceras infectadas, heridas, quemaduras, escaras y gastroenteritis bacterianas en niños, sobre todo en algunas resistencias a antibióticos (Molan, 1992). El efecto bacteriostático y bactericida de las mieles frescas y sin calentar se ha demostrado frente a numerosas bacterias, muchas de ellas patógenas (Lin et al., 2011; Voidarou et al., 2011; Mohapatra et al., 2012). El primero depende principalmente de la concentración de la miel, mientras que el efecto bactericida depende tanto de la concentración de la miel como del tiempo de acción (Bogdanov, 2017b). Se ha estudiado la sensibilidad que presentan muchas bacterias frente a la miel, entre otras *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Streptococcus* spp y *Shighella* spp (Osés et al., 2016).

En cuanto a la actividad de las mieles frente a hongos y levaduras, existen estudios que muestran que, según su composición, varias mieles poseen capacidad antifúngica (Al-Waili et al., 2013). Más concretamente, se ha mostrado que algunas mieles tienen actividad contra dermatofitos y frente a hongos, sobre todo del género *Candida* (Ahmed et al., 2012).

Se ha observado que la miel también inhibe *in vitro* el crecimiento de virus como el de la Rubeola (Zeina et al., 1996) y de algunas especies de parásitos de los géneros *Leishmania* (Bahrami et al., 2011) y *Echinococcus* (Kilicoglu et al., 2006).

El mecanismo antibacteriano de la miel no se conoce por completo, pero muchos investigadores afirman que la miel inhibe el crecimiento bacteriano a causa de varios factores; los más importantes son la alta concentración de azúcar; el bajo contenido de humedad (actividad del agua entre 0,56 y 0,62), que dificulta el crecimiento de casi cualquier microorganismo; el bajo pH; la producción de peróxido de hidrógeno y la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos y otros componentes fitoquímicos como metilglioxal, leptosina, melanoidinas y radicales hidroxilo (Osés et al., 2016).

El peróxido de hidrógeno es uno de los principales componentes responsable de la actividad antibacteriana de la miel y fue el primer compuesto antibacteriano estudiado en este alimento (Brudzynski, 2006). La glucosa oxidasa sintetizada en las glándulas hipofaríngeas de las abejas cataliza la formación de peróxido de hidrógeno en el proceso de oxidación de la glucosa a ácido glucónico (Weston et al., 1999). La actividad de la glucosa oxidasa se ve muy reducida en presencia de elevadas concentraciones de azúcares por lo que permanece casi inactiva a no ser que la miel se diluya, por ello la miel natural apenas posee H₂O₂, pero al entrar en contacto con una herida se diluye la miel con los fluidos de la herida y se produce *in situ* el agua oxigenada con el efecto antiséptico correspondiente en la herida tratada (White et al., 1963; Weston, 2000). La actividad antibacteriana del peróxido de la miel es sensible al calor, la luz y el almacenamiento (Bogdanov, 1997), por lo que Bogdanov (2017b) recomendó el almacenamiento de la miel en lugares frescos y oscuros, y utilizar miel fresca.

Varios estudios han mostrado que la destrucción del H₂O₂ por adición de catalasa a la miel diluida no elimina completamente el efecto antibacteriano por lo que en la miel existen otros compuestos con dicha actividad lo que se conoce como actividad antibacteriana no peróxido de la miel que depende en gran medida del origen floral de la misma. Entre las sustancias responsables de esta actividad tenemos compuestos presentes en numerosas mieles como los flavonoides (flavonas, flavonoles, flavononas y dehidroflavonoles) (Cushnie y Lamb, 2005), compuestos fenólicos (ácidos cinámicos y sus ésteres) (Aljadi y Yusoff, 2003) o la enzima lisozima (Snowdon y Cliver, 1996). Estos compuestos son resistentes a la luz y al calor con lo que mantienen su actividad durante más tiempo que el H₂O₂ (Bogdanov, 1997).

Otros estudios han demostrado que el metilglioxal (MGO) y la royalisina (defensina-1 de abeja) son los compuestos no-peróxido principalmente responsables de la actividad antibacteriana en algunas mieles. Las mieles de manuka (*Leptospermum scoparium*), originarias de Nueva Zelanda, contienen niveles muy altos de MGO (Mavrick et al., 2008). Esta miel es muy conocida por sus propiedades antimicrobianas, ya que presenta efecto

inhibidor frente a 60 especies bacterianas, incluyendo aeróbicas, anaeróbicas, Gram-positivas y Gram-negativas (Khan et al., 2017). También se ha comprobado que las mieles de manuka presentan efectos inhibidores contra el virus de la gripe (Watanabe et al., 2014) y el MGO, en particular, manifiesta efectos contra el virus VIH1 (Behbahani, 2014). La actividad antibacteriana de las mieles de manuka varía entre lotes (Allen et al., 1991; Oelschlaegel et al., 2012), de modo que cada lote de esta miel debe ser analizado para determinar la actividad antibacteriana, expresada como "factor manuka único" (UMF). Cuanto más alto sea el UMF, mayor es la actividad antibacteriana. En general se acepta que la miel con un UMF de 10 es apropiada para uso medicinal (Wallace et al., 2009). Se ha encontrado MGO en mieles de diferentes fuentes botánicas, pero sus concentraciones han sido mucho más bajas que en las mieles de manuka (Paulus et al., 2012). Algunas personas pueden presentar efectos negativos al consumir mieles de manuka con UMF alto (20-30) por lo que el nivel de UMF óptimo para uso terapéutico se sitúa en niveles de 10 a 18 (Adam et al., 2008; Mavric et al., 2008).

En cuanto a la royalisina (defensina-1 de abeja), Kwakman et al. (2012) demostró que la miel contiene este compuesto, que forma parte del sistema inmune de la abeja, atribuyéndole gran parte de las propiedades antibacterianas de la miel. Es un péptido antimicrobiano (AMP) identificado en la hemolinfa (el sistema sanguíneo de abeja) y las glándulas hipofaríngeas de las abejas (Nolan et al., 2019). Su papel dentro de la abeja es el de una respuesta inmune innata, presentando actividad contra hongos, levaduras, protozoos y bacterias Gram positivas (sobre todo *B. subtilis*, *S. aureus* y *Paenibacillus larvae*) y Gram negativas (Oryan et al., 2016), sin embargo, tiene una eficacia limitada contra los organismos multirresistentes (Kwakman, 2012). Aunque no se ha dilucidado el mecanismo completo de acción de la defensina-1, se ha demostrado que esta proteína de abeja puede ser importante en la cicatrización de heridas (Bucekova et al., 2017).

Por último, destacaremos que la miel por su actividad antimicrobiana y su capacidad de inhibir la autofermentación y el autodeterioro también es utilizada para aumentar la vida útil de diferentes alimentos (Machado De-Melo et al., 2018). Por ejemplo, la miel al 30% logró mantener la calidad de ciertos pescados, susceptibles de pudrirse durante el proceso de almacenamiento a temperatura ambiente porque tiene un contenido alto de agua y proteínas (Hakim et al., 2019). Otro ejemplo es el estudio de Pótorak et al. (2018) donde la miel multifloral retrasó el crecimiento microbiano en embutidos, aportándoles los beneficios de sus polifenoles naturales, que pueden proteger contra enfermedades degenerativas. Además, la capacidad de absorción de humedad de la miel mejora la conservación de productos de panadería (Kaur et al., 2021).

5.3. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

Numerosos estudios han avalado las propiedades antiinflamatorias de la miel, observando que, en heridas sin infección bacteriana, la miel también demostró tener actividad antiinflamatoria (Postmes, 2001). Dichos efectos fueron estudiados por Al-Waili y Boni (2003)

observando como bajaban los niveles plasmáticos de prostaglandinas y tromboxano tras la ingesta de miel. Se han realizado estudios que demuestran cierta actividad sobre algunas enzimas como la ciclooxigenasa-1 y la ciclooxigenasa-2, impidiendo que continúen su función. La miel también disminuye la cantidad de compuestos inflamatorios potentes, incluyendo las prostaglandinas como la PGE2 (prostaglandina E2), la PGF2a (prostaglandina F2a) y el tromboxano B2 en plasma (Erguder et al., 2008). Esta actividad es atribuida a compuestos de tipo flavonoide, como la crisina y la galangina, que reducen la expresión del COX-2, enzima clave para que se desencadene el proceso inflamatorio, inhiben la liberación de citocinas proinflamatorias, así como las expresiones de la óxido nítrico sintasa inducible y la producción de especies reactivas de oxígeno (Candiracci et al., 2012). Woo et al. (2005) y Kao et al. (2010) demostraron que flavonoides como la crisina y la quercetina tenía actividades antiinflamatorias similares, pero con diferentes mecanismos. Otro compuesto presente en la miel con efecto antiinflamatorio es el éster fenilético del ácido cafeico que inhibe la secreción del ácido araquidónico en la membrana de la célula (Viuda Martos et al., 2008).

En varios experimentos realizados con animales de laboratorio también se ha demostrado que la miel puede reducir la inflamación (Owoyele et al., 2014; Bogdanov, 2017b). Kassim et al. (2010) mostraron en ratas la reducción de edemas tras la ingesta tanto de miel como de sus extractos, por la inhibición de mediadores inflamatorios. Para ratas con enfermedad intestinal, la miel fue un tratamiento eficaz en la colitis inflamatoria, por la desactivación de la producción de radicales libres, aunque según los investigadores podría estar también relacionado indirectamente con la actividad antibacteriana de este alimento (Bilsel et al., 2002). Otro ejemplo es la reducción de la inflamación artificial provocada en conejos que la miel llevo a cabo, posiblemente por una caída tanto de la actividad de la peroxidasa de la miel como de la infiltración de neutrófilos (Kassim et al., 2012), así como la disminución de la inflamación inducida por carragenina en la patas de ratas de experimentación provocada por miel de Gelam de Malasia (Hussein et al., 2013).

Al igual que con la actividad antimicrobiana existen algunas mieles que han demostrado una mayor actividad antiinflamatoria, como son las mieles de rewarewa, manuka y kanuka de Nueva Zelanda, que disminuyen la síntesis *in vitro* de superóxido de neutrófilos humanos (Leong et al., 2012). La eficacia de la miel de manuka y sus componentes como agentes antiinflamatorios también se ha comprobado en estudios que afirman que esta miel suprime la producción de citoquinas inflamatorias como la interleucina1 β (IL-1 β) e IL-6 (Gasparrini et al., 2018). Es importante recordar que las citoquinas son mediadores necesarios para conducir la respuesta inflamatoria hacia las regiones de infección y lesión, favoreciendo la cicatrización apropiada de la herida (Lin et al., 2000).

Otros estudios que demuestran la actividad antiinflamatoria de las mieles son el de Biluca et al. (2020) en el que dos de las ocho mieles de abejas sin aguijón del sur de Brasil analizadas aumentaron la secreción de citocinas antiinflamatorias (interleucina-10) o el de Osés et al. (2020) en el que las actividades antiinflamatorias de las mieles de madroño fueron significativas y mostraron mayor actividad que sus extractos, obteniendo una inhibición de la

hialuronidasa entre 40 y 80%, mientras Da Silva et al. (2016) obtuvo valores de inhibición de 40% en mieles de madroño, 60% en mieles de cítricos y de 80% en mieles de lavanda a una concentración de 35,7 g/l. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los mecanismos moleculares de la actividad antiinflamatoria de las mieles y de los flavonoides aún no se han aclarado, precisando más investigaciones para contrastar los procesos desencadenantes de la actividad antiinflamatoria de la miel (Farooqui y Farooqui, 2014).

5.4. ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA

La hipertensión es una enfermedad en sí misma que provoca un importante porcentaje de muertes y además actúa como uno de los factores de riesgo cardiovascular más importantes (Poulter, 2003). La Organización Mundial de la Salud, OMS, calcula que la hipertensión provoca más del 60% de las enfermedades cerebro-vasculares y casi un 50% de la enfermedad isquémica cardíaca. La hipertensión es una de las causas principales de muerte prematura en el mundo y una de las metas mundiales es reducir la prevalencia de la hipertensión en un 25% en 2025 (frente a los valores de 2010). Un problema adicional es el aumento de la esperanza de vida ya que la hipertensión aumenta con el envejecimiento. La mayoría de las personas hipertensas ignoran que lo son, pues la enfermedad no siempre va acompañada de síntomas o signos de alerta, por eso se dice que mata silenciosamente y es tan importante su control periódico (OMS, 2021).

La presión arterial está controlada por diferentes vías, como se refleja en la Figura 15.

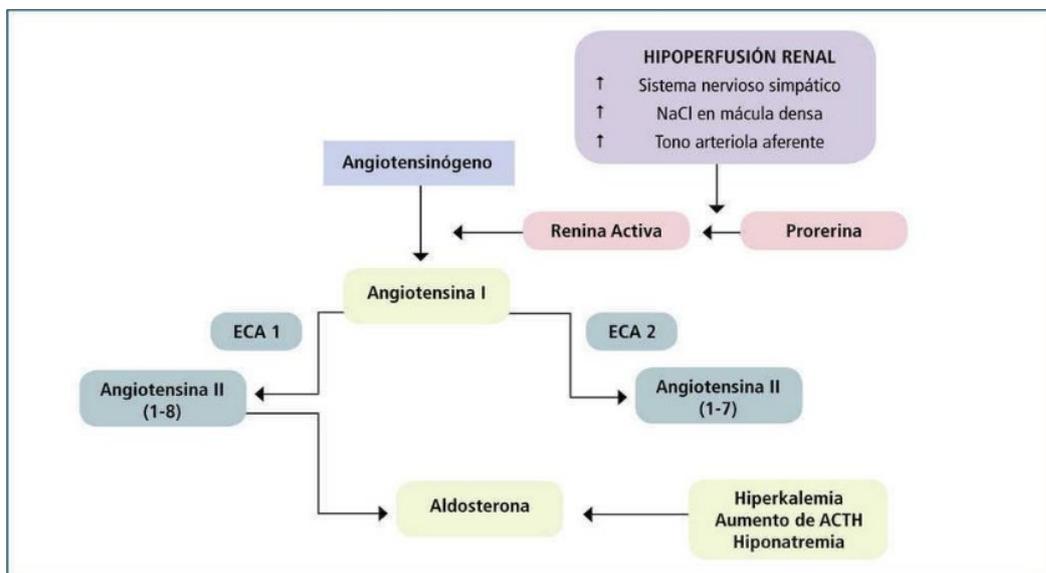


Figura 15. Esquema de control de la presión arterial (Benavente et al.,2010)

El sistema renina-angiotensina, junto con el sistema quinina-caliceína juegan un papel importantísimo en el control de la presión arterial. Ambos sistemas están regulados por la enzima convertidora de angiotensina (ECA, en inglés ACE) por lo que su inhibición tiene efecto hipotensor. En base a esto el tratamiento actual de la hipertensión incluye el uso de antagonistas de los receptores de Angiotensina II, de antagonistas de los canales T de calcio,

diuréticos e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. Estos medicamentos poseen elevada efectividad, pero también algunos efectos secundarios o reacciones adversas indeseables y se pueden dar diversas interacciones con medicamentos y alimentos (FitzGerald y Murray, 2006). Por ello es muy importante buscar alimentos que puedan ayudar a inhibir la ACE, contribuyendo al tratamiento de la hipertensión arterial. En varios alimentos se han encontrado sustancias antihipertensivas como los péptidos derivados de leche (Ortiz-Chao et al., 2009; González-González et al., 2011) o polifenoles presentes en hierbas usadas en la medicina tradicional china (Liu et al., 2003).

Hay pocos estudios sobre la eficacia antihipertensiva de la miel. Nagai et al. (2012) determinaron en mieles de *Echium vulgare* su capacidad antihipertensiva, mostrando a concentraciones de un 25 % una inhibición de la actividad ACE del 85 %, y al 50 %, una inhibición del 94 %. León-Ruiz et al. (2013) observaron grandes variaciones dentro del mismo tipo de mieles, siendo la miel de castaño la más activa de todas las mieles con una actividad ACE en la mayoría de las muestras superior al 50%.

Los flavonoides presentes en la miel, como la quercetina y el kaempferol, muestran resultados prometedores en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Terzo et al., 2020). Un estudio realizado por Sánchez et al. (2006) determinó que el tratamiento con 10 mg/kg de quercetina durante 13 semanas redujo la presión arterial y la frecuencia cardíaca en ratas espontáneamente hipertensas (Sánchez et al., 2006). Otro estudio *in vitro* demostró que la quercetina ejerce efectos vasodilatadores en el cordón umbilical humano y efectos vasodilatadores agudos *in vivo* en sujetos humanos normotensos (Pérez et al., 2014).

A pesar de los pocos estudios llevados a cabo sobre la actividad antihipertensiva de la miel, los realizados han mostrado resultados muy positivos por lo que es necesario profundizar en investigaciones sobre este efecto beneficioso de las mieles.

5.5. OTRAS PROPIEDADES

A la miel se le atribuyen otras propiedades terapéuticas y medicinales como son la curación y cicatrización de heridas, actividad antimutagénica y antitumoral, actividad hepatoprotectora, hipoglucemiante y actividad frente a desórdenes intestinales entre otras (Bogdanov et al., 2008; Alvarez-Suarez et al., 2010). Revisaremos alguna de las propiedades citadas:

CURACIÓN Y CICATRIZACIÓN DE HERIDAS

La curación y cicatrización de heridas cutáneas son la respuesta de reparación a multitud de patologías producidas por trauma, cirugía y/o quemaduras que producen la restauración de las células dañadas. Se han empleado diferentes métodos antimicrobianos para tratar heridas agudas y crónicas, pero muchos se han vuelto ineficaces debido a la aparición de resistencias microbianas. Por esta razón, se han buscado terapias alternativas siendo la miel ampliamente estudiada y utilizada en la cicatrización de heridas y quemaduras. La miel es un agente antimicrobiano que promueve la limpieza del tejido necrótico, estimula el crecimiento de los tejidos de la herida y, finalmente, inicia una actividad antiinflamatoria que reduce rápidamente

el dolor, el edema y la producción de exudado (Oryan et al., 2016). Esta propiedad curativa ha sido investigada en profundidad por varios autores (Molan, 2006; Rozaini et al., 2012). Entre las características de la miel que favorecen la curación y cicatrización de las heridas destacaremos su amplia gama de compuestos activos, incluidos flavonoides, ácidos orgánicos, ácidos fenólicos, vitaminas y enzimas (Rozaini et al., 2004), su gran cantidad de aminoácidos que favorece la formación de colágeno (Hoffman, 2002), el H₂O₂ que contiene promueve la proliferación celular, el crecimiento de fibroblastos y células epiteliales que reparan el daño, y favorece el desarrollo de nuevos capilares en el tejido dañado (Viedma, 2020), las altas cantidades de carbohidratos que incluyen fructosa, glucosa, maltosa, sacarosa y otros tipos son responsables de la alta osmolaridad de la miel (Oryan et al., 2016), el pH de la miel que proporciona un ambiente ácido que no es adecuado para el crecimiento bacteriano, además este bajo pH mejora la liberación de oxígeno de la hemoglobina en los capilares y promueve la cicatrización de heridas (Anastasiou et al., 2021).

La aplicación tópica de miel como apósito para heridas reduce la inflamación, produce una cicatrización más rápida por estimulación de la regeneración tisular, debido a su alta osmolaridad, las bacterias no tienen acceso suficiente al agua para crecer y eventualmente mueren (Oryan et al., 2016), mejora en la comodidad del vendaje debido a la baja adhesión del apósito a los tejidos y elimina el tejido necrótico (Molan et al. 2006; Rozaini et al., 2012). La aplicación tópica de miel también se plantea como un enfoque efectivo y económico para el manejo del pie diabético complicado (Anastasiou et al., 2021). Los hidrogeles de miel, parecen ser medios óptimos para mejorar la cicatrización húmeda de heridas al favorecer la absorción de fluidos, y retener agua (Hoffman, 2002).

Se han patentado apósitos impregnados en miel para el tratamiento de heridas como Revamil® o como Active Manuka®, Medihoney® o Activon® provenientes de miel de manuka. Estas mieles, para poder ser utilizadas en aplicaciones médicas, han de ser esterilizadas con radiaciones y así destruir las esporas de clostridios que pudieran contener, aunque no todas las mieles toleran estas radiaciones sin perder sus propiedades (León-Ruiz, 2013).

ACTIVIDAD ANTIMUTAGÉNICA Y ANTITUMORAL

Algunos estudios han evidenciado que los efectos terapéuticos y profilácticos de la miel frente a cánceres causados por factores medioambientales, mutagénicos y carcinogénicos y diversos autores han investigado la inhibición del crecimiento de tumores y de líneas celulares tumorales *in vitro* (Samarghandian et al., 2011; Saxena et al., 2012). El efecto antitumoral de la miel parece estar relacionado con su actividad antioxidante, por la presencia de algunos compuestos fenólicos, como quercetina, ácido p-cumarico, y ácido cafeico (Alvarez-Suárez et al., 2010). En uno de los estudios realizados por Wang et al. (2002) en siete mieles y un preparado azucarado similar a la miel se compararon los efectos antimutagénicos frente a un mutágeno muy frecuente en la dieta humana, el Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimetil-5Hpirido [4,3-b] indol). Descubrieron que el efecto fue similar en la miel y en el preparado glucídico, esto parece indicar que los flavonoides no fueron los responsables del efecto antimutagénico sino

los azúcares. Sin embargo, Saxena et al. (2012) encontraron que son los compuestos fenólicos uno de los principales factores anticancerígenos en la miel. Tsiapara et al. (2009) también señalaron como responsables de este efecto a los compuestos fenólicos y vieron que una dieta rica en miel de tomillo, en lugar de azúcar, puede ayudar a prevenir el cáncer de próstata, de mama y de células endometriales. Algunos estudios sobre mieles de Malasia informaron de actividades efectivas contra varios tipos de cáncer (oral, vesical, cervical, hepático, óseo y de mama) (Rao et al., 2016). Otro estudio demostró que la miel de shaoka (*Fagonia bruguieri*) presenta una actividad anticancerígena en hepatocarcinoma y células de cáncer de mama superior al de la miel de manuka de Nueva Zelanda (Halawani, 2021).

PROPIEDADES PREBIÓTICA Y PROBIÓTICAS

Desde tiempos de los romanos se conoce el uso beneficioso de la miel en la prevención y tratamiento de los trastornos gastrointestinales como úlceras peptídicas, gastroenteritis o gastritis (Bogdanov et al., 2008). La miel fresca tiene Bifidobacterias y bacterias *Lactobacillus* (Olofsson y Vasquez, 2008) que son beneficiosos para la salud humana. Los prebióticos estimulan potencialmente la actividad de la flora intestinal, alterando su composición y aportando energía a especies microbianas seleccionadas (Abdellah y Abderrahim, 2014). Se han observado posibles efectos prebióticos de las mieles, atribuido a sus oligosacáridos, cuyas acciones han sido similares al de los fructooligosacáridos (Sanz et al., 2005).

Algunos autores señalan como responsables de la función de la miel como protector gástrico a los flavonoides ya que aumentan el contenido mucoso de las prostaglandinas de la mucosa gástrica e inhiben las secreciones ácidas, previniendo de esta forma la ulceración (Bogdanov et al., 2008). Otras teorías defienden la sinergia de varios componentes como responsables de esta propiedad, entre ellos: flavonoides, saponinas, esteroides, terpenos, gomas y mucílagos (Viuda-Martos et al., 2008). La miel es un inhibidor de la bacteria *Helicobacter pylori*, causante de úlceras peptídicas y gastritis (Ali et al., 1991; Al Somal et al., 1994). Otros estudios (Abdellah y Abderrahim, 2014), afirman que varios compuestos de miel podrían inhibir además del desarrollo de *Helicobacter pylori*, el de otros patógenos como el *Staphylococcus aureus*. El posible mecanismo de acción sería la unión de oligosacáridos a las paredes celulares de las bacterias, evitando la adhesión a los tejidos humanos. Sin embargo, todavía no está claro si todas las mieles tienen efectos prebióticos y, de ser así, si algunas mieles tienen un efecto prebiótico más fuerte (Bogdanov, 2017b).

En otro estudio realizado sobre mieles monoflorales italianas se demostró su capacidad para estimular el crecimiento de las cepas probióticas del intestino (Fратиanni et al., 2021). En el estudio realizado por Paşca et al. (2021) se concluyó que la miel cruda rumana puede ser un reservorio potencial de probióticos, aportando un beneficio para la salud de los consumidores.

Por último, indicar que aunque se ha visto que existen muchos estudios que aportan evidencias sobre las actividades biológicas de distintas mieles, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha evaluado 8 peticiones que se han pedido sobre

declaraciones saludables de la miel, no siendo autorizadas por la Unión Europea ninguna de ellas, de acuerdo con el Reglamento 1924/2006 (DOUE, 2006; EFSA, 2010; EFSA, 2011) debido a que no se considera que esté suficientemente caracterizado el producto (Comisión Europea, 2022), por lo que se necesitan más estudios que ayuden a esclarecer todas las propiedades biológicas de la miel.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo ha sido caracterizar de mieles de distintos orígenes botánicos producidas en Castilla y León (España) en función de su análisis melisopalinológico, estudio de compuestos volátiles y semivolátiles, de compuestos fenólicos y de sus propiedades biológicas. En segundo lugar, estudiar el efecto de distintas extracciones, química y fisiológica (digestión *in vitro*) sobre dichos compuestos fenólicos y propiedades biológicas.

Los objetivos específicos han sido:

- 1 - Determinar el origen botánico por melisopalinología de las 30 mieles utilizadas en este estudio.
- 2 - Realizar el estudio de componentes volátiles y semivolátiles sobre las mieles objeto de estudio.
- 3 - Investigar que componentes volátiles y semivolátiles de las mieles analizadas pueden resultar de utilidad para su caracterización botánica.
- 4 - Determinar el perfil fenólico mediante HPLC de un número representativo de mieles de distintos orígenes botánicos de Castilla y León.
- 5 - Estudiar y determinar la cantidad de fenoles totales, flavonoides totales, así como las propiedades biológicas (actividad antioxidante, antimicrobiana y anti-inflamatoria) de un número representativo de mieles de distintos orígenes botánicos de Castilla y León.
- 6.- Evaluar la influencia de la extracción química y fisiológica en los compuestos fenólicos totales y en las actividades biológicas de la miel.

III. MUESTRAS Y PLAN DE TRABAJO

III. MUESTRAS Y PLAN DE TRABAJO

1. MUESTRAS DE MIEL

Para la realización de este trabajo se han utilizado 30 mieles de diferentes orígenes botánicos procedentes de apiarios de diferentes localizaciones de Castilla y León, recolectadas y facilitadas a la Universidad de Burgos en otoño de 2016 por apicultores locales. Hasta la realización de los distintos análisis, las muestras fueron conservadas a temperatura ambiente (20 °C).

2. ANÁLISIS MELISOPALINOLÓGICO

El origen botánico de mieles se determinó mediante análisis melisopalínológico estimativo (Louveaux et al., 1978). La preparación de muestras para el análisis polínico de la miel se realizó siguiendo el método descrito por Terradillos et al. (1994), con alguna modificación.

2.1. REACTIVOS

Agua destilada

H₂SO₄ (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)

Etanol (VWR International Eurolab, parte de Avantor, Llinars del Vallés, Cataluña, España)

Hidrato de cloral (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Éter etílico (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Verde de metilo (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)

2.2. MATERIALES

Centrífuga (Heraeus Megafuge 16R, Thermo Fisher Sci. Osterode am Harz, Germany)

Microscopio (Carl Zeiss, Göttingen, Germany)

2.3. PROCEDIMIENTO

Se pesaron 10 g de miel (20 g en el caso de las mieles claras) y se disolvieron en 50 ml de agua destilada y unas gotas de ácido sulfúrico 1/3. Esta dispersión se centrifugó durante 10 minutos a 3°C y a 4800 rpm. Posteriormente se eliminó la fase líquida y el sedimento se re-dispersó con agua y unas gotas de etanol absoluto, volviéndose a centrifugar durante 5 minutos a 4800 rpm. Tras eliminar la fase líquida, se añadieron al sedimento de las muestras 15 ml de una solución hidroalcohólica de hidrato de cloral y éter etílico, centrifugándose luego a 5500 rpm durante 10 minutos. Una vez eliminada la fase líquida, sobre el sedimento se

añadieron 2 gotas de disolución hidroalcohólica de verde de metilo glicerizada y se homogenizó perfectamente y se montó la preparación entre porta y cubre.

Con estas preparaciones se llevó a cabo un análisis microscópico estimativo a 1000 aumentos. El conteo polínico y de elementos indicadores de mielada, así como la interpretación de los resultados se realizaron en el laboratorio del área de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Burgos siguiendo las normas de la Comisión Internacional de Botánica Apícola (Louveaux et al., 1978) y de los actuales procedimientos normalizados por la Comisión Internacional de la Miel (Von der Ohe et al., 2004). El resultado del análisis polínico de todas las mieles analizadas se refleja en la Tabla 3 y muestra siete mieles milflores, cinco de viborera, cinco de brezo, tres de trébol, tres de aliaga, dos de mielada, dos de bosque, una de cuernecillo, una zarzamora y una de castaño.

Tabla 3. Origen botánico de las 30 muestras de miel analizadas melisopolinológicamente

MUESTRA	ORIGEN BOTÁNICO	NOMBRE CIENTÍFICO
M1	Mielada	
M2	Mielada	
BQ1	Bosque	
BQ2	Bosque	
V1	Viborera	Boraginaceae tipo <i>Echium</i> sp.
V2	Viborera	Boraginaceae tipo <i>Echium</i> sp.
V3	Viborera	Boraginaceae tipo <i>Echium</i> sp.
V4	Viborera	Boraginaceae tipo <i>Echium</i> sp.
V5	Viborera	Boraginaceae tipo <i>Echium</i> sp.
BR1	Brecina/Biercol/Brezo	Ericaceae tipo <i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull
BR2	Brecina/Biercol/Brezo	Ericaceae tipo <i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull
BR3	Brecina/Biercol/Brezo	Ericaceae tipo <i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull
BR4	Brecina/Biercol/Brezo	Ericaceae tipo <i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull
BR5	Brezo	Ericaceae tipo <i>Erica</i> sp.
A1	Aliaga	Leguminosae tipo <i>Genista</i> sp. (<i>Adenocarpus</i> sp., <i>Calycotome</i> sp., <i>Cytisus</i> sp., <i>Erinacea</i> sp., <i>Genista</i> sp., <i>Retama</i> sp., <i>Spartium</i> sp., <i>Ulex</i> sp., entre otros)
A2	Aliaga	Leguminosae tipo <i>Genista</i> sp. (<i>Adenocarpus</i> sp., <i>Calycotome</i> sp., <i>Cytisus</i> sp., <i>Erinacea</i> sp., <i>Genista</i> sp., <i>Retama</i> sp., <i>Spartium</i> sp., <i>Ulex</i> sp., entre otros)
A3	Aliaga	Leguminosae tipo <i>Genista</i> sp. (<i>Adenocarpus</i> sp., <i>Calycotome</i> sp., <i>Cytisus</i> sp., <i>Erinacea</i> sp., <i>Genista</i> sp., <i>Retama</i> sp., <i>Spartium</i> sp., <i>Ulex</i> sp., entre otros)
ML1	Milflores	
ML2	Milflores rica en castaño	
ML3	Milflores	
ML4	Milflores	

MUESTRA	ORIGEN BOTÁNICO	NOMBRE CIENTÍFICO
ML5	Milflores rica en aliaga	
ML6	Milflores rica en viborera	
ML7	Milflores	
T1	Trébol	Leguminosae tipo <i>Trifolium sp.</i> (<i>Medicago sp.</i> , <i>Robinia sp.</i> , <i>Anthyllis sp.</i> , <i>Ononis sp.</i> , <i>Trifolium sp.</i> , entre otros)
T2	Trébol	Leguminosae tipo <i>Trifolium sp.</i> (<i>Medicago sp.</i> , <i>Robinia sp.</i> , <i>Anthyllis sp.</i> , <i>Ononis sp.</i> , <i>Trifolium sp.</i> , entre otros)
T3	Trébol	Leguminosae tipo <i>Trifolium sp.</i> (<i>Medicago sp.</i> , <i>Robinia sp.</i> , <i>Anthyllis sp.</i> , <i>Ononis sp.</i> , <i>Trifolium sp.</i> , entre otros)
C1	Cuernecillo	Leguminosae tipo <i>Lotus sp.</i>
Z1	Zarzamora	Rosaceae tipo <i>Rubus sp.</i>
CS1	Castaña	Fagaceae tipo <i>Castanea sativa Miller</i>

3. SELECCIÓN DE MUESTRAS PARA EL ESTUDIO DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y PROPIEDADES BIOLÓGICAS

De las 30 muestras de miel a las que hemos realizado el análisis polínico y el estudio de compuestos volátiles y semivolátiles, hemos seleccionado las 15 mieles que se indican en la Tabla 4.

Tabla 4. Listado de las 15 muestras seleccionadas para realizar el estudio de compuestos fenólicos y actividad biológica

Número de muestra	Origen botánico	Miel seleccionada
H1	Mielada	M1
H2	Mielada	M2
H3	Bosque	BQ1
H4	Bosque	BQ2
H5	Viborera	V1
H6	Viborera	V2
H7	Viborera	V3
H8	Brezo	BR1
H9	Brezo	BR2
H10	Brezo	BR3
H11	Brezo	BR4
H12	Brezo	BR5
H13	Aliaga	A1
H14	Aliaga	A2
H15	Aliaga	A3

En esas 15 mieles reflejadas en la Tabla 4, se llevaron a cabo a cabo los siguientes análisis:

- Estudio sobre los compuestos fenólicos de las mieles de distinto origen botánico mediante HPLC.
- Estudio de la influencia de distintos procedimientos de extracción (extracción química y extracción fisiológica (digestión *in vitro*)) en la composición de fenoles, en la de flavonoides totales y en las distintas propiedades biológicas de la miel en comparación con la miel cruda (Figura 16).

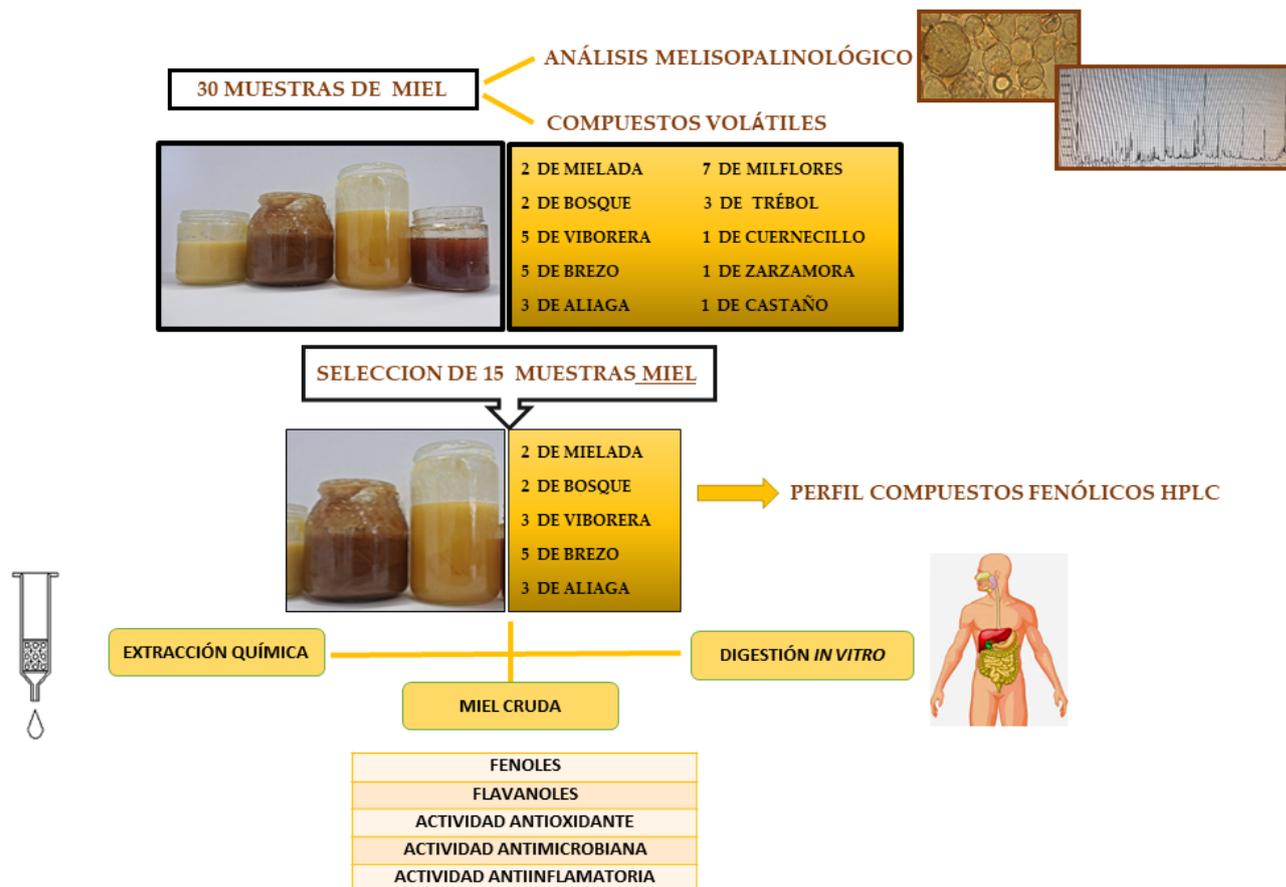


Figura 16. Esquema de parámetros evaluados en las distintas muestras

IV. RESULTADOS

IV.I. ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES Y SEMIVOLÁTILES EN MIELES DE CASTILLA Y LEÓN

1. INTERES DE LOS AROMAS EN LA MIEL Y MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Cada miel tiene un perfil aromático único que depende del origen botánico, la climatología, de las características de las abejas o de las condiciones de procesado y conservación de la miel entre otros factores. El aroma es uno de los parámetros más apreciados de la miel, el perfil aromático ha sido estudiado durante años y es un tema de gran interés, ya que a menudo las fragancias desprendidas determinan la aceptación y compra por parte de los consumidores. El aroma, además es uno de los factores más importantes en la identificación de la miel debido al elevado número de compuestos volátiles que caracterizan cada producto y origen botánico. El perfil de compuestos aromáticos determina también su calidad organoléptica siendo responsables de parte de su actividad biológica (Rodríguez Terradillos, 2018).

La cromatografía de gases es la técnica más usada en la determinación de los perfiles en compuestos volátiles y semivolátiles de las mieles debido a su sensibilidad y versatilidad, pero uno de los puntos más delicados en la determinación de estos compuestos es la obtención de extractos representativos, ya que el rango de los compuestos extraídos depende en gran medida de la técnica de aislamiento empleada para eliminar agua, azúcares y otros interferentes. Los procedimientos de extracción de los componentes volátiles y semivolátiles son muy diversos y los vamos a exponer teniendo en cuenta el mecanismo de extracción empleado y subdividiéndolos según el uso o no de disolventes. Algunos estudios comparativos sobre diferentes técnicas de extracción (Prosen et al., 2010; Jerković et al., 2011), concluyen que ninguno de estos métodos puede ser considerado como totalmente representativo; todos poseen ventajas y desventajas que pueden influir en la correcta interpretación e identificación de los compuestos volátiles.

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN QUE EMPLEAN DISOLVENTES

EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

Esta técnica ha sido muy utilizada para la caracterización de las mieles por la simplicidad del proceso, no requiere un equipamiento excesivamente caro, permite la extracción de componentes volátiles y semivolátiles de un amplio rango y extrae en el mismo proceso ácidos orgánicos. Al no precisar cambios de temperatura, los compuestos termolábiles no sufren ninguna modificación y puede asociarse con facilidad a técnicas de separación (GC) e identificación (espectroscopía de masas).

Entre los inconvenientes de este método está el que se pueden extraer algunos componentes que puedan deteriorar la columna cromatográfica y que algunos analitos, al ser enmascarados por el disolvente, no pueden ser detectados.

Las condiciones de este sistema de extracción se han ido mejorando, como puede verse en alguno de los estudios desarrollados (Wootton et al., 1978; Rowland et al., 1995; D'Arcy et al., 1997). El método de extracción utilizado en nuestro estudio ha sido una modificación del procedimiento de D'Arcy et al. (1997).

EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La extracción en columna es una técnica alternativa a las habituales para el análisis de compuestos volátiles. Este proceso se realiza sin calor y, por lo tanto, sin alterar la composición de los compuestos del perfil de compuestos volátiles de las mieles. Guyot-Declerck et al. (2000) comprobaron el buen funcionamiento de las columnas XAD-2 para el análisis de norisoprenoides. El uso de polímeros ayuda a aislar mayor número de compuestos volátiles, pero sigue siendo necesario el uso de disolventes para recuperar los compuestos recogidos en el polímero.

EXTRACCIÓN SIMULTANEA CON DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR (SDE)

La extracción simultanea con destilación por arrastre de vapor (SDE) se ha aplicado con éxito a compuestos relacionados con el aroma de la miel (Castro-Vázquez et al., 2008) pero requiere mucho tiempo, una cantidad bastante alta de la muestra y temperaturas elevadas que producen artefactos y proporcionan resultados difíciles de comparar (Verzera y Concurso, 2012). La mayoría de los métodos aplicados a la miel combinan la extracción con acetona o, más recientemente, extracción de diclorometano bajo una atmósfera inerte seguida de destilación bajo corriente de vapor de agua.

EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS

La extracción con solventes a temperatura ambiente asistida por ultrasonidos es un buen método para aislar compuestos relacionados con el aroma en la miel (Alissandrakis et al., 2009; Jerković et al., 2009). En esta técnica la muestra se extrae al baño maría con asistencia de ultrasonidos, utiliza bajas cantidades de disolventes orgánicos y reduce tiempos de extracción. El efecto mecánico de los ultrasonidos proporciona una mayor penetración del solvente en la matriz a través de efectos de cavitación y mejorando en gran medida la eficiencia de extracción (Jerković et al., 2009).

EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Los procesos de extracción con este tipo de fluidos son más rápidos al ser capaces de penetrar y difundir por matrices de muy diferente tipo. Dean et al. (1998) utilizando el metanol al 1% como solvente y a unas condiciones de 38°C y 3500 psi, obtuvieron un extracto con una gran cantidad de sustancias volátiles de miel de *Magnolia officinalis*, pero el resultado fue superior en el extracto obtenido con disolventes.

METODOS DE EXTRACCIÓN QUE NO EMPLEAN DISOLVENTES

EXTRACCIÓN EN ESPACIO DE CABEZA

EXTRACCIÓN EN ESPACIO DE CABEZA ESTÁTICO (SHS)

Este método rara vez se ha aplicado en el análisis de la fracción volátil de la miel debido a las bajas concentraciones de compuestos volátiles en este alimento y a las bajas recuperaciones de componentes semivolátiles (Rowland et al., 1995; Cuevas-Glory et al., 2007).

EXTRACCIÓN EN ESPACIO DE CABEZA DINÁMICO

Es una técnica que permite el análisis de una amplia gama de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles, arrastra los compuestos volátiles a un espacio llamado de cabeza situado sobre la muestra por una corriente de gas inerte y posteriormente se atrapan sobre un material adsorbente. Los compuestos volátiles son recuperados mediante lavado con disolvente o desorción térmica para posteriormente ser analizados por cromatografía de gases. Radovic et al. (2001) emplearon esta técnica para un estudio de caracterización botánica y geográfica de mieles, trabajando a temperatura ambiente. Los resultados que se obtuvieron fueron cuantitativamente inferiores a las técnicas tradicionales de extracción con disolvente.

EXTRACCIÓN EN ESPACIO DE CABEZA DINÁMICO “PURGE AND TRAP”

El espacio de cabeza dinámico llamado “*purge-and-trap*”, se produce tras una pequeña variación del espacio de cabeza dinámico tradicional en la que la corriente del gas inerte es sometida a barrido sobre la muestra sólida o burbujeada a través del líquido, pero sólo en un pequeño espacio cerrado o trampa. El espacio de cabeza dinámico “*purge-and-trap*”, tiene la ventaja de identificar y cuantificar un amplio rango de componentes volátiles y semivolátiles. Esta técnica y sus modificaciones, se han utilizado para caracterizar mieles de diferentes orígenes geográficos y botánicos (Radovic et al., 2001).

EXTRACCIÓN EN ESPACIO DE CABEZA DINÁMICO CON CRIOENFOQUE

En esta variación de espacio de cabeza dinámico los compuestos se condensan y concentran a la entrada de una columna a baja temperatura. Esta variación denominada crioenfoco, fue aplicada en el análisis de los aromas de la miel de *Robinia pseudoacacia* (Barcarolo et al., 1997). En este sistema la mayor ventaja es la disminución del tiempo de análisis.

MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME)

EXTRACCIÓN POR SPME ASOCIADA A ESPACIO DE CABEZA

Microextracción en fase sólida (SPME) y microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (HD SPME) son los métodos más utilizados en la actualidad. Se han usado mucho en los últimos años para el análisis de los componentes del aroma por su sencillez, alta sensibilidad y bajo coste (Karabagias et al., 2014; Moniruzzaman et al., 2014). Los compuestos volátiles se concentran en una fibra, siendo las más usadas: PDMS (polidimetilsiloxano), PDMS/DVB (polidimetilsiloxano/divinilbenceno), CAR/PDMS (carboxeno/polidimetilsiloxano), DVB/CAR/PDMS (divinilbenceno/ carboxeno/ polidimetilsiloxano), CW/DVB (carbowax/

divinilbenceno) y PA (poliacrilato), cada una extrae una gama de compuestos diferente. Hay muchos factores implicados en la eficiencia de extracción, como la polaridad de los recubrimientos de fibra, el espesor de la película de recubrimiento de fibra, el tamaño del vial, el volumen de muestra, la adición de sales, el pH, la temperatura o la agitación magnética entre otros (Verzera y Concurso, 2012). En un estudio sobre la comparación de la microextracción en fase sólida y del espacio de cabeza dinámico como técnicas de extracción de la fracción volátiles de mieles (Mazón, 2021), los resultados han puesto de manifiesto que la miel de lavanda se ha diferenciado mejor por la microextracción en espacio de cabeza ya que es especialmente rica en compuestos muy volátiles. En la actualidad aún no se ha alcanzado unanimidad sobre qué fibras comerciales son las más adecuadas para los análisis volátiles de la miel.

2. OBJETIVO

El objetivo de este estudio fue el analizar los compuestos volátiles y semivolátiles de 30 mieles de distinto origen botánico de Castilla y León y determinar distintos compuestos que puedan servir para caracterizarlas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MUESTRAS

Se evaluaron los compuestos volátiles y semivolátiles en las 30 muestras de miel descritas en el capítulo III. Muestras y plan de trabajo. Como se ha indicado siete mieles eran milflores, cinco de viborera (Boraginaceae tipo *Echium* sp.), cinco de brezo (Ericaceae tipo *Erica* sp. y tipo *Calluna vulgaris*), tres de trébol (Leguminosae tipo *Trifolium* sp), tres de aliaga (Leguminosae tipo *Genista scorpius*), dos de mielada, dos de bosque, una de cuernecillo (Leguminosae tipo *Lotus* sp.), una de zarzamora (Rosaceae tipo *Rubus* sp.) y una de castaño (Fagaceae tipo *Castanea sativa* Miller).

3.2. REACTIVOS Y MATERIALES

REACTIVOS:

Acetato de etilo (Merck, Steinheim, Alemania)

Undecanoato de metilo (Sigma-Aldrich parte de Merck, Steinheim, Alemania)

Heptadecanoato de metilo (Sigma-Aldrich parte de Merck, Steinheim, Alemania)

Sulfato sódico (Panreac, Barcelona, España)

Agua destilada

MATERIALES:

Balanza analítica (Sartorius LA 310 S)

Agitador mecánico de hélice (Ika Labortechnik)

Viales ámbar 4 ml (VWR International Eurolab)

Jeringas de 10 μ l y de 1 ml (Hamilton)

Pipetas Pasteur de vidrio (Normax)

Pipetas Pasteur de plástico (VWR)

Rotavapor (Büchi R-124)

Baño termostático de agua (Grant Instruments)

Filtros Whatman N°1 (Whatman™)

Cromatógrafo de gases con inyector Split/Splitless HP 6890 (Hewlett Packard)

Detector de masas HP 5973 (Hewlett Packard)

Columna capilar SGE BPX-5 de 50 m de longitud, 0,22 mm de diámetro interno y 0,25 μ m de espesor de película.

Gas portador de Helio N-52 (Air Liquide).

3.3. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES Y SEMIVOLÁTILES

En primer lugar, se procedió a la extracción con acetato de etilo de compuestos volátiles y semivolátiles presentes en 30 g (3 x 10 g) de miel, utilizando una modificación del procedimiento de D`Arcy et al. (1997), cuyo esquema de extracción se refleja en la Figura 17.

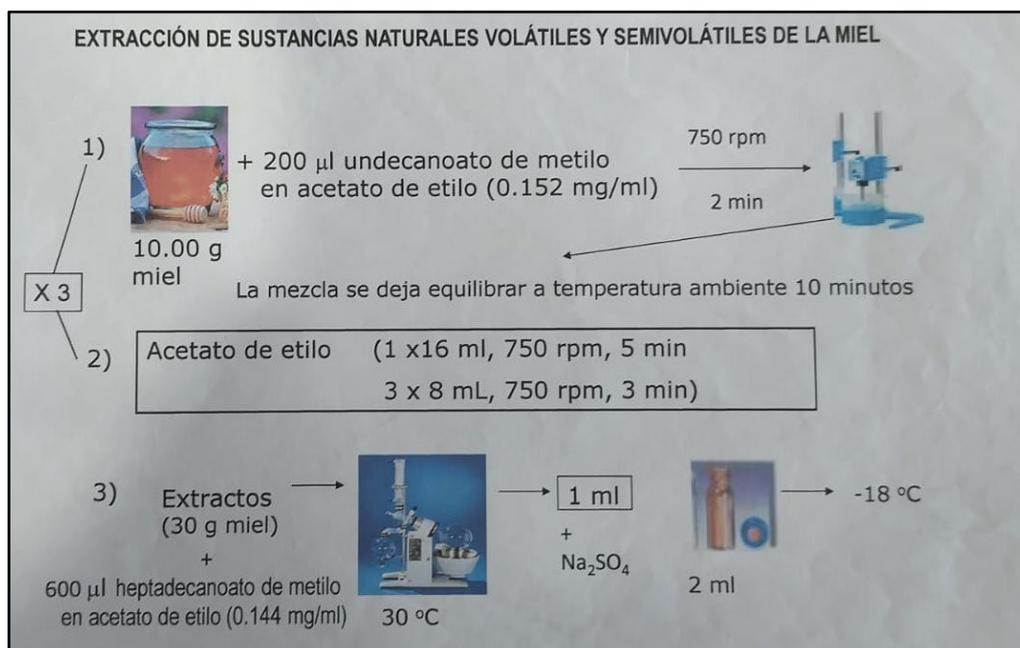


Figura 17. Esquema del protocolo de extracción de compuestos volátiles y semivolátiles

Para ello se pesaron 10 g de miel en un vaso de precipitados de 250 ml, se añadieron 200 μ l de undecanoato de metilo en acetato de etilo (0,152 mg/ml), y se mezcló todo a 750 rpm

durante 2 minutos con la ayuda de un agitador mecánico. La mezcla se dejó 10 minutos a temperatura ambiente para que alcanzará el equilibrio. A continuación, se extrajeron los compuestos volátiles y semivolátiles en 4 pasos:

1º- Se adicionaron 16 ml de acetato de etilo a la mezcla y se sometió a extracción con agitación a 750 rpm durante 5 minutos. El extracto resultante se traspasó a un matraz redondo de fondo plano. Seguidamente, la misma miel se sometió a tres extracciones sucesivas, con 8 ml de acetato de etilo cada una, con agitación durante 3 minutos a 750 rpm. Los extractos obtenidos se añadieron al matraz redondo de fondo plano utilizado anteriormente.

2º- El proceso se repitió con otras dos alcuotas de 10 gramos de miel, obteniendo así un extracto final procedente de 30 g de miel sobre el que se añadieron 600 µl de heptadecanoato de metilo en acetato de etilo (0,144 mg/ml).

3º- El extracto se concentró en rotavapor a 30°C (Figura 18) hasta un volumen próximo a 1 ml. Una vez finalizado, se adicionó una punta de espátula de sulfato sódico anhidro con el fin de eliminar los posibles restos de agua del extracto y se filtró.



Figura 18. Rotavapor Büchi R-124

4º- El matraz se lavó con acetato de etilo con ayuda de una jeringuilla, se filtró y se adicionó al filtrado inicial hasta completar un total de 2 ml de filtrado, se guardó en un vial de 4 ml de color ámbar que se etiquetó y se almacenó a -18°C hasta el momento de realizar el análisis cromatográfico.

3.4. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Tras la extracción, se procedió a la detección de los compuestos volátiles y semivolátiles presentes en los extractos. Para ello, se inyectó 1 µl del extracto en el cromatógrafo de gases. (Figura 19)



Figura 19. Cromatógrafo de gases HP 6890 Hewlett Packard con inyector Split/Splitless

Las condiciones cromatográficas seleccionadas fueron las siguientes:

Modo de inyección splitless.

Gas portador: Helio

Temperatura del inyector: 250°C.

Presión de la columna: 22,6 psi.

Flujo de gas portador y de purga 22,9 ml/min y 20 ml/min respectivamente.

Velocidad lineal media: 25 cm/min

Temperatura del horno programada: La temperatura inicial es de 50°C durante 4 minutos. Se incrementa 5°C/minuto hasta alcanzar los 90°C. Al cabo de un minuto la temperatura aumenta a razón de 3°C/minuto hasta llegar a 250°C que se mantienen 10 minutos. Por último, la temperatura se incrementa 15°C/minuto hasta los 320°C, temperatura que se mantiene durante otros 10 minutos. Tiempo de la cromatografía de 90 minutos.

Temperatura de la línea de transferencia, del cuadrupolo y de la fuente del detector de masas es de 280°C, 150°C y 230°C respectivamente.

Solvent delay de 8 minutos.

Modo de detección scan con un rango de masas entre 30 y 300 m/z.

3.5. ANÁLISIS CUALI-CUANTITATIVO DE COMPUESTOS VOLÁTILES Y SEMIVOLÁTILES

Tras los procesos de extracción, separación e identificación, se obtuvieron diversos compuestos volátiles y semivolátiles para cada una de las mieles. Este conjunto de compuestos se denomina huella aromática. El análisis cualitativo se realizó comparando los tiempos de retención con el del patrón y mediante una comparativa entre el espectro de cada pico y la librería de masas Wiley 275 G1035A. Para su cuantificación, se usaron las áreas de cada pico comparándose con el área del primer patrón interno (undecanoato de metilo) en cada cromatograma. El segundo patrón interno (heptadecanoato de metilo) se añade para verificar que no se producen pérdidas de compuestos volátiles y semivolátiles durante la concentración en rotavapor.

Los compuestos se clasificaron en grupos como se ve en la Tabla 5, asignando un color a cada grupo para facilitar la interpretación de resultados.

Tabla 5. Grupos de compuestos volátiles y semivolátiles representados por colores

Compuestos alifáticos
Derivados del benceno
Compuestos de calentamiento y envejecimiento
Norisoprenoides
Compuestos heterocíclicos
Terpenoides
Flavonoides
Compuestos policíclicos
Compuestos desconocidos

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el análisis de volátiles y semivolátiles se realizó un estudio mediante el gráfico de cajas y bigotes para determinar que compuestos eran capaces de diferenciar las muestras por origen botánico. Con los compuestos que mostraron mayor separación se realizó el análisis de componentes principales (PCA) para poder observar variables que agrupan a las muestras. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statgraphics Centurion XVIII (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, VA, EEUU).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Figuras 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 y 29 muestran, a modo de ejemplo, los cromatogramas correspondientes a mieles de mielada, bosque, viborera, brezo, aliaga, milflores, trebol, cuernecillo, zarzamora y castaño, respectivamente.

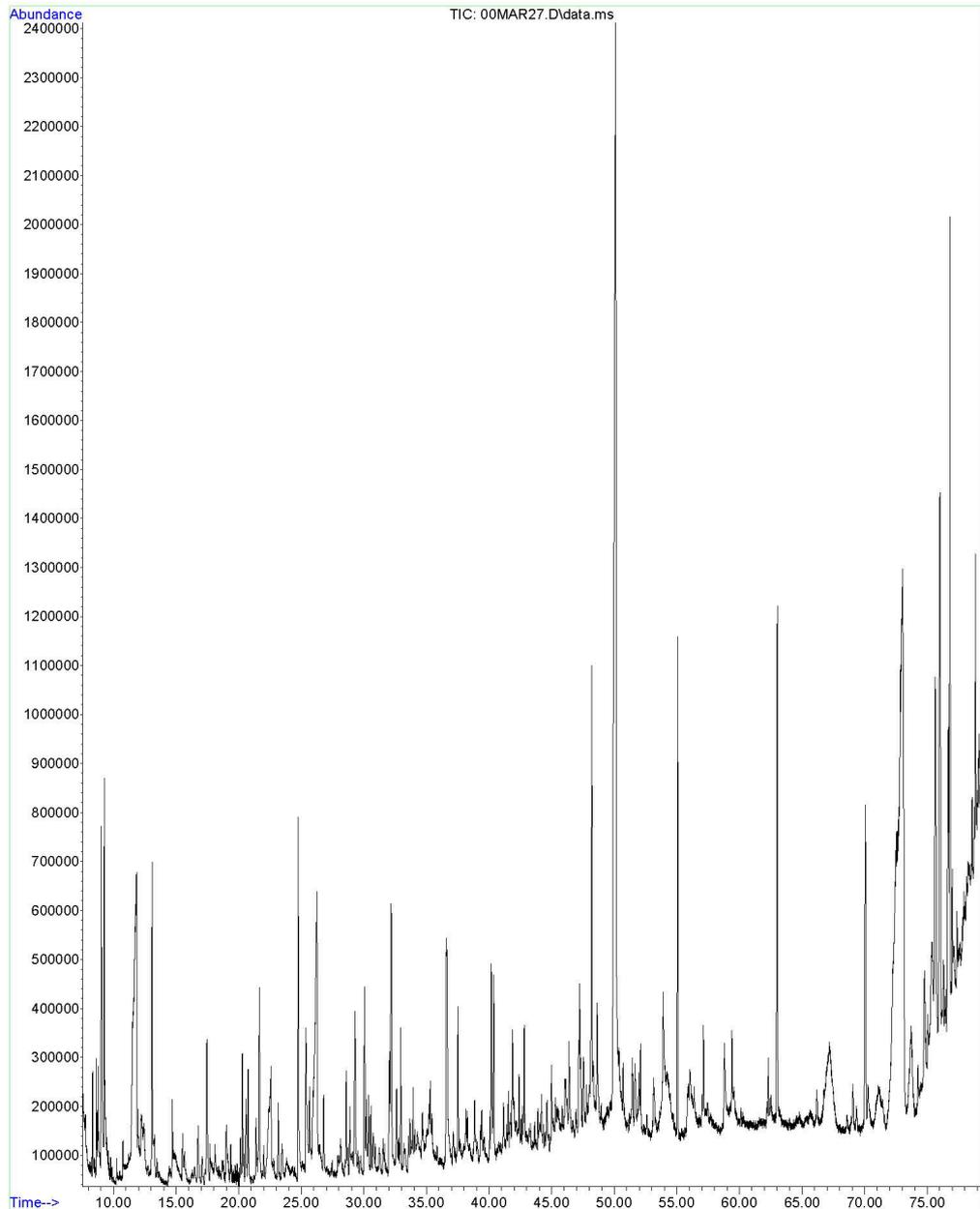


Figura 20. Cromatograma de una miel de mielada. Muestra M1

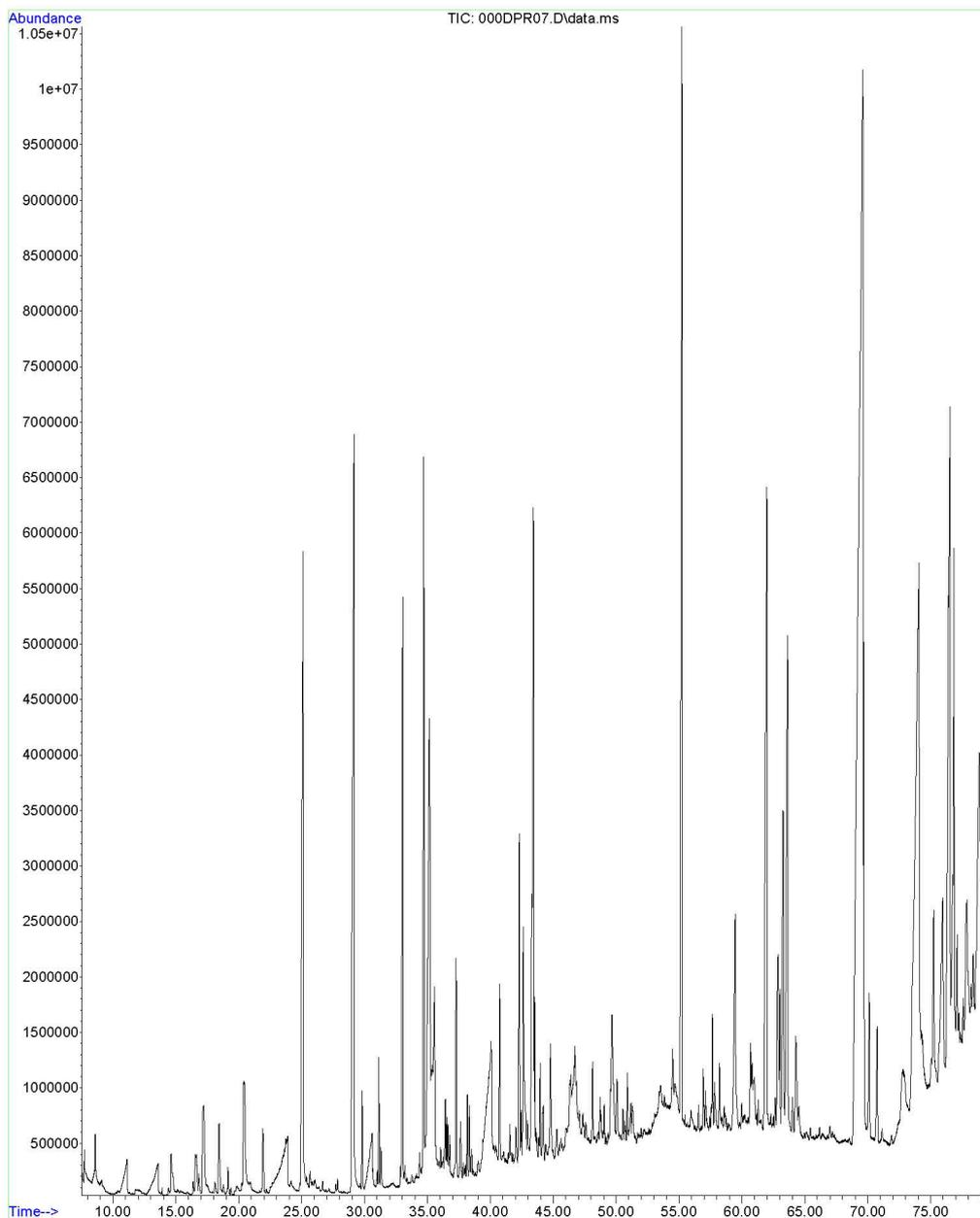


Figura 21. Cromatograma de una miel de bosque. Muestra BQ1

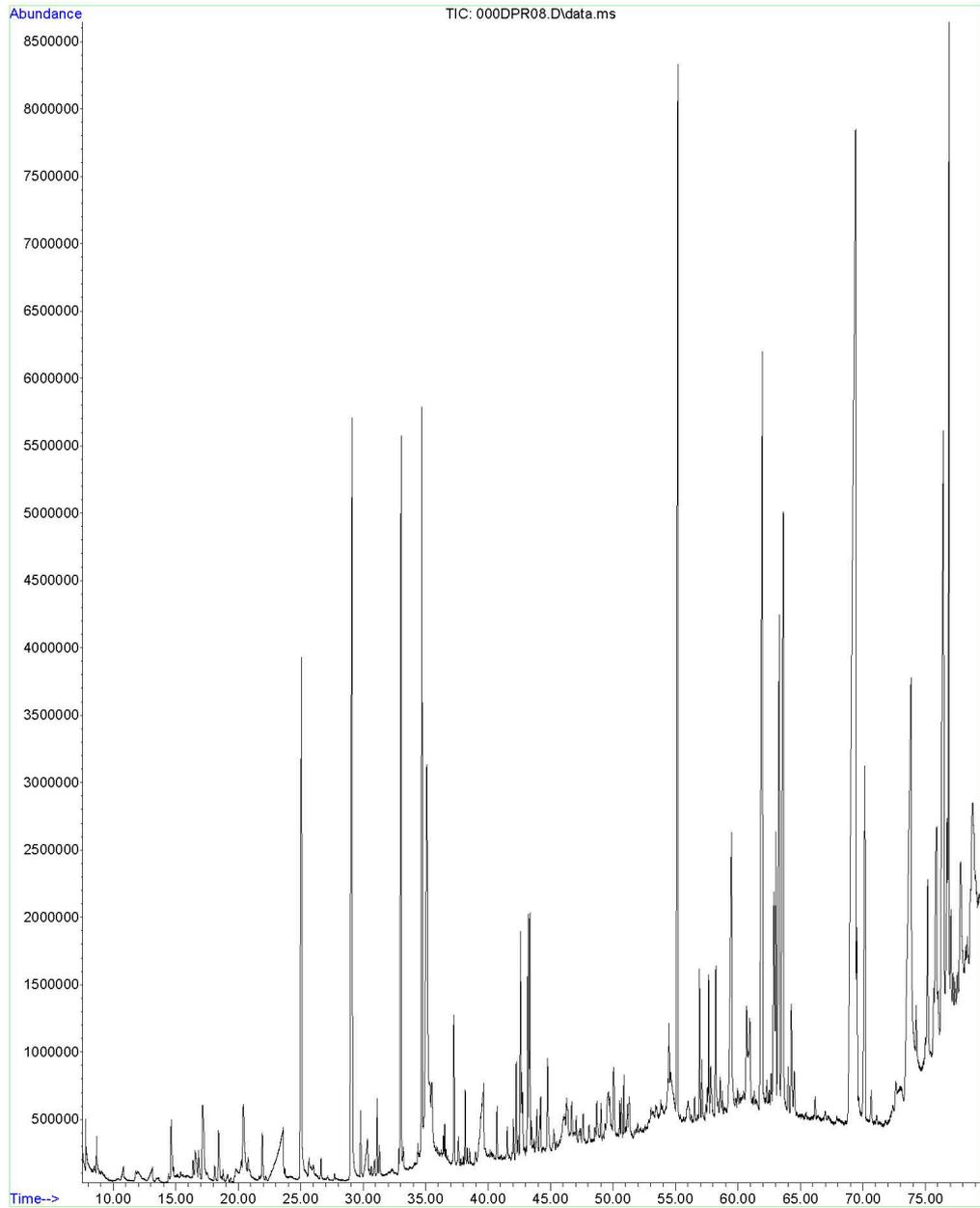


Figura 20. Cromatograma de una miel de viborera. Muestra V2

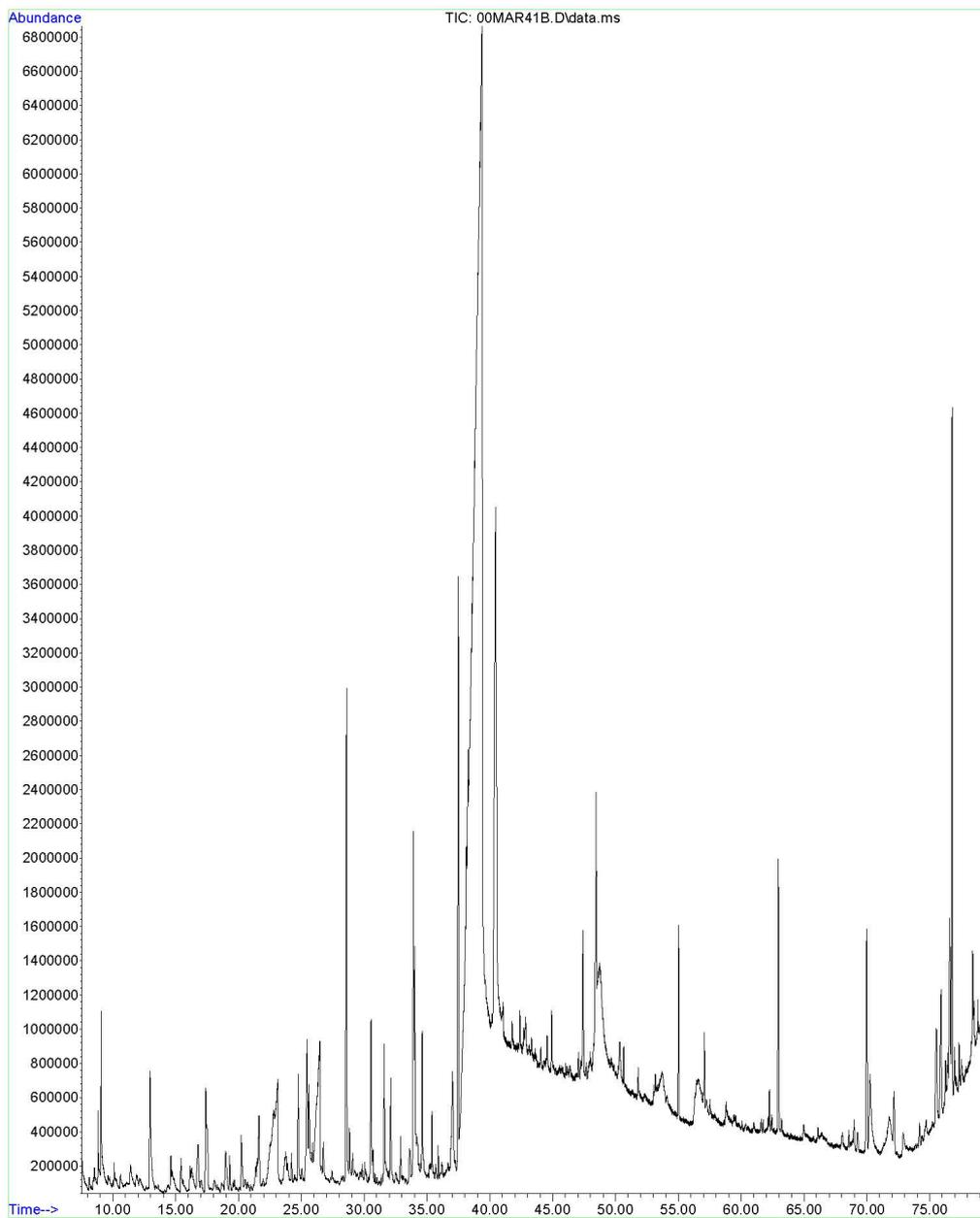


Figura 213. Cromatograma de una miel de brezo. Muestra BR2

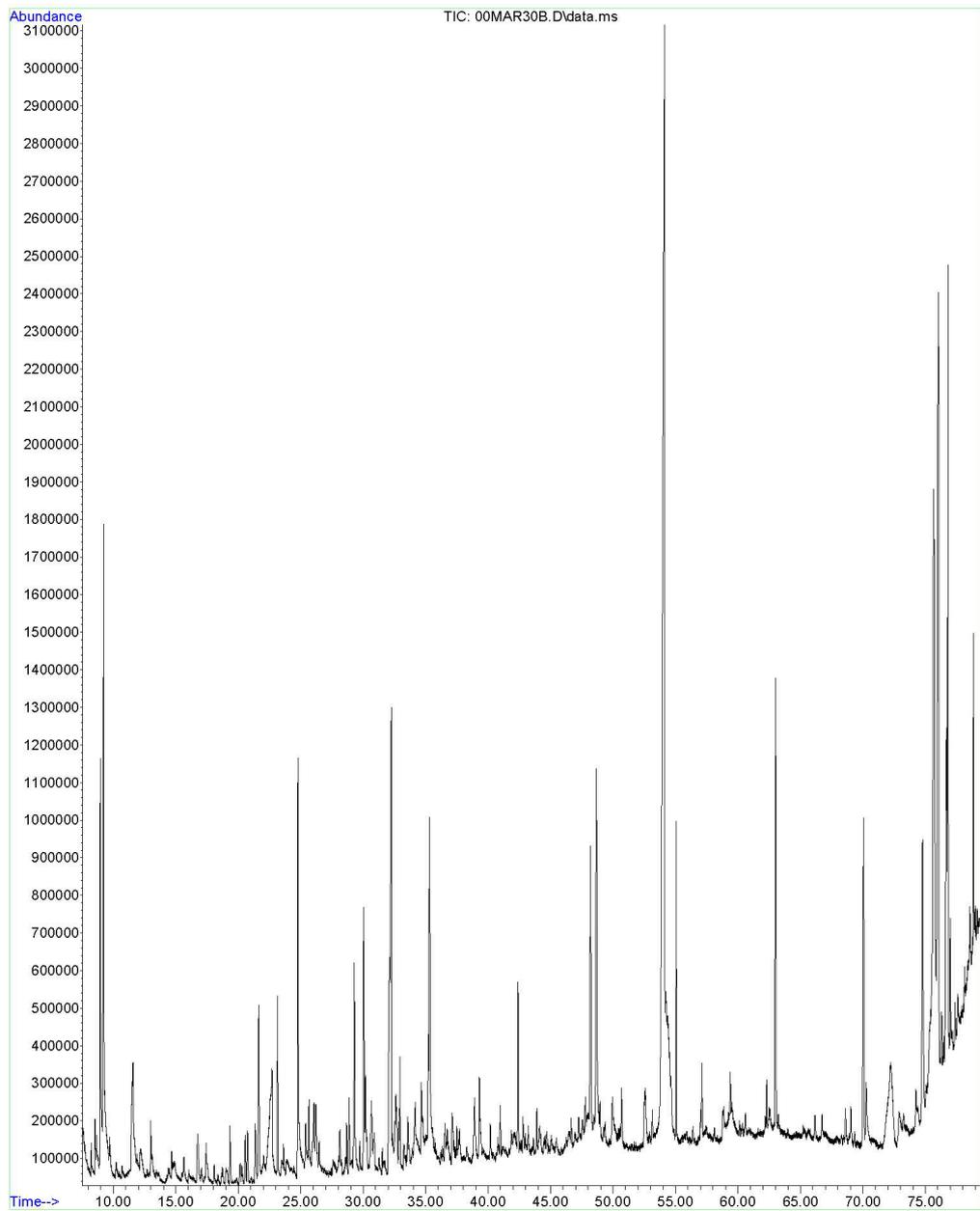


Figura 22. Cromatograma de una miel de aliaga. Muestra A2

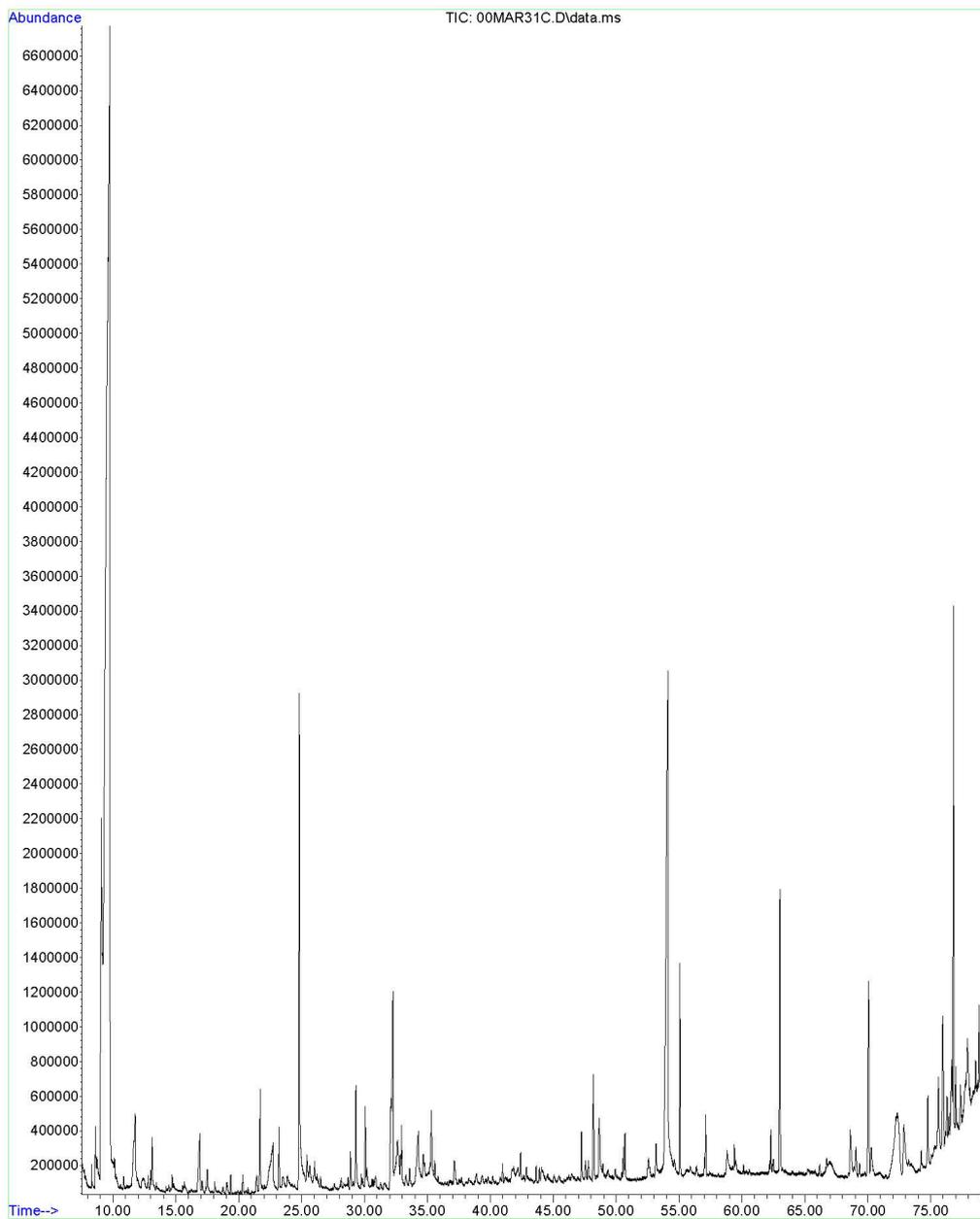


Figura 23. Cromatograma de una miel de milflores. Muestra ML4

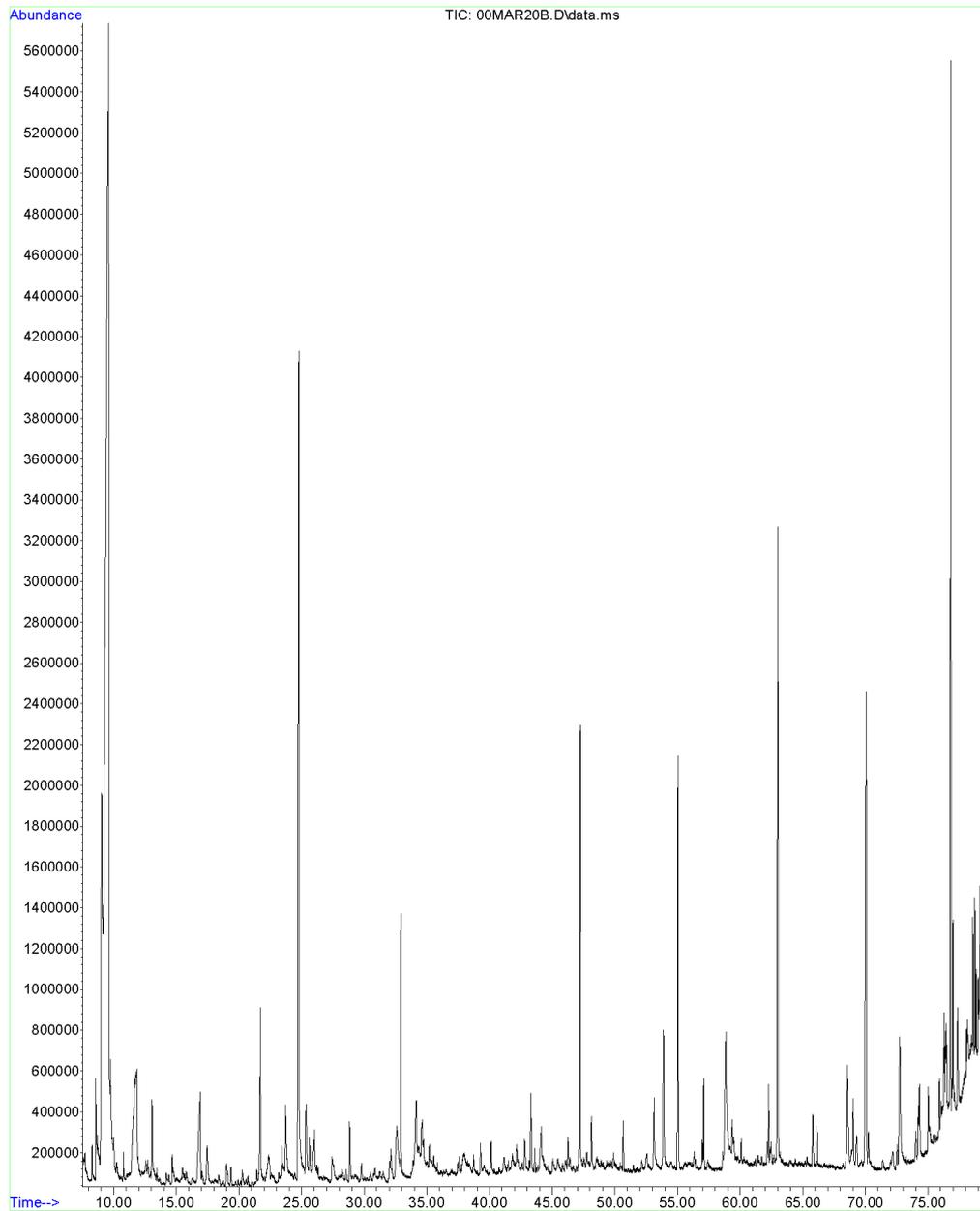


Figura 246. Cromatograma de una miel de trébol. Muestra T1

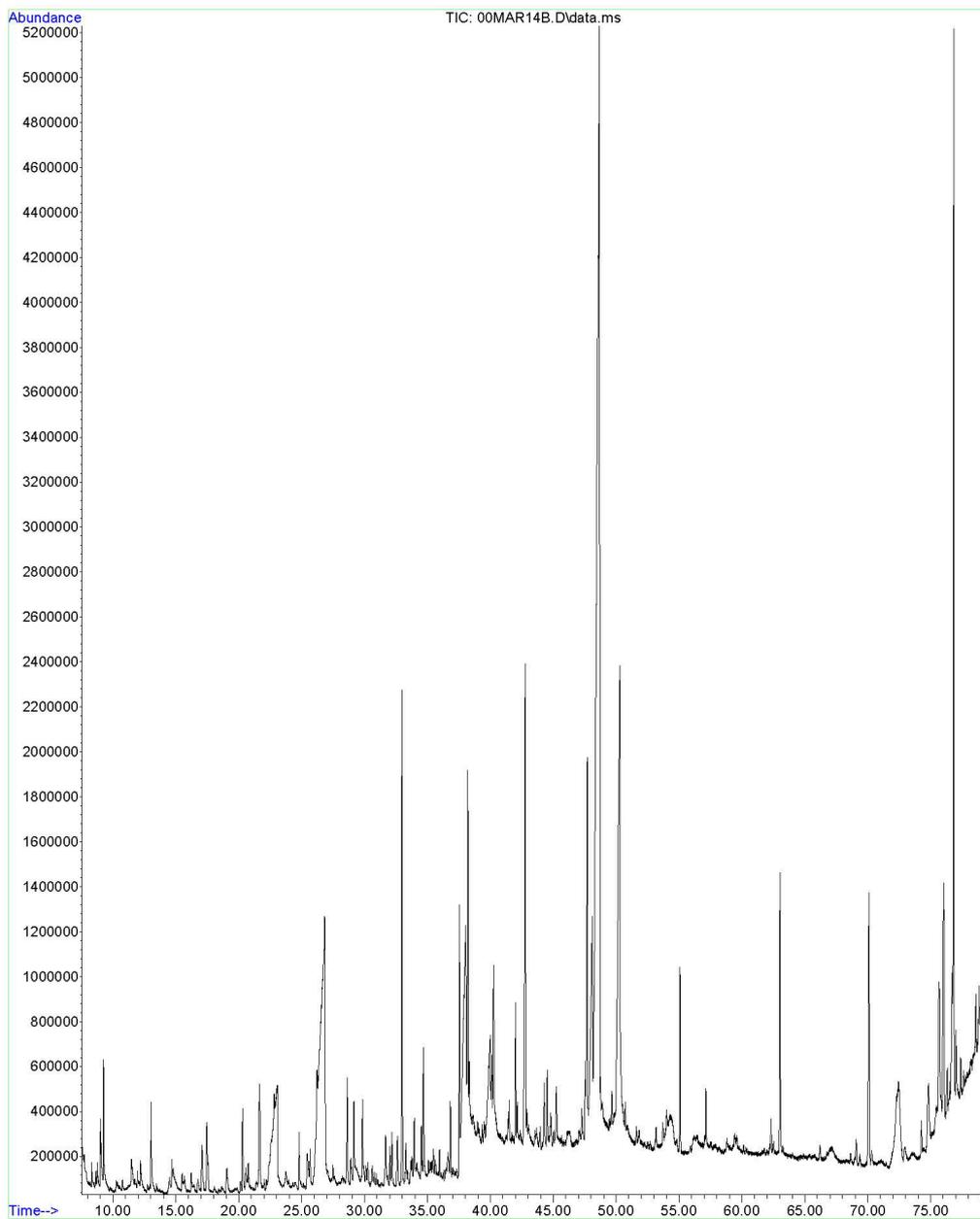


Figura 257. Cromatograma de una miel de cuernecillo. Muestra C1

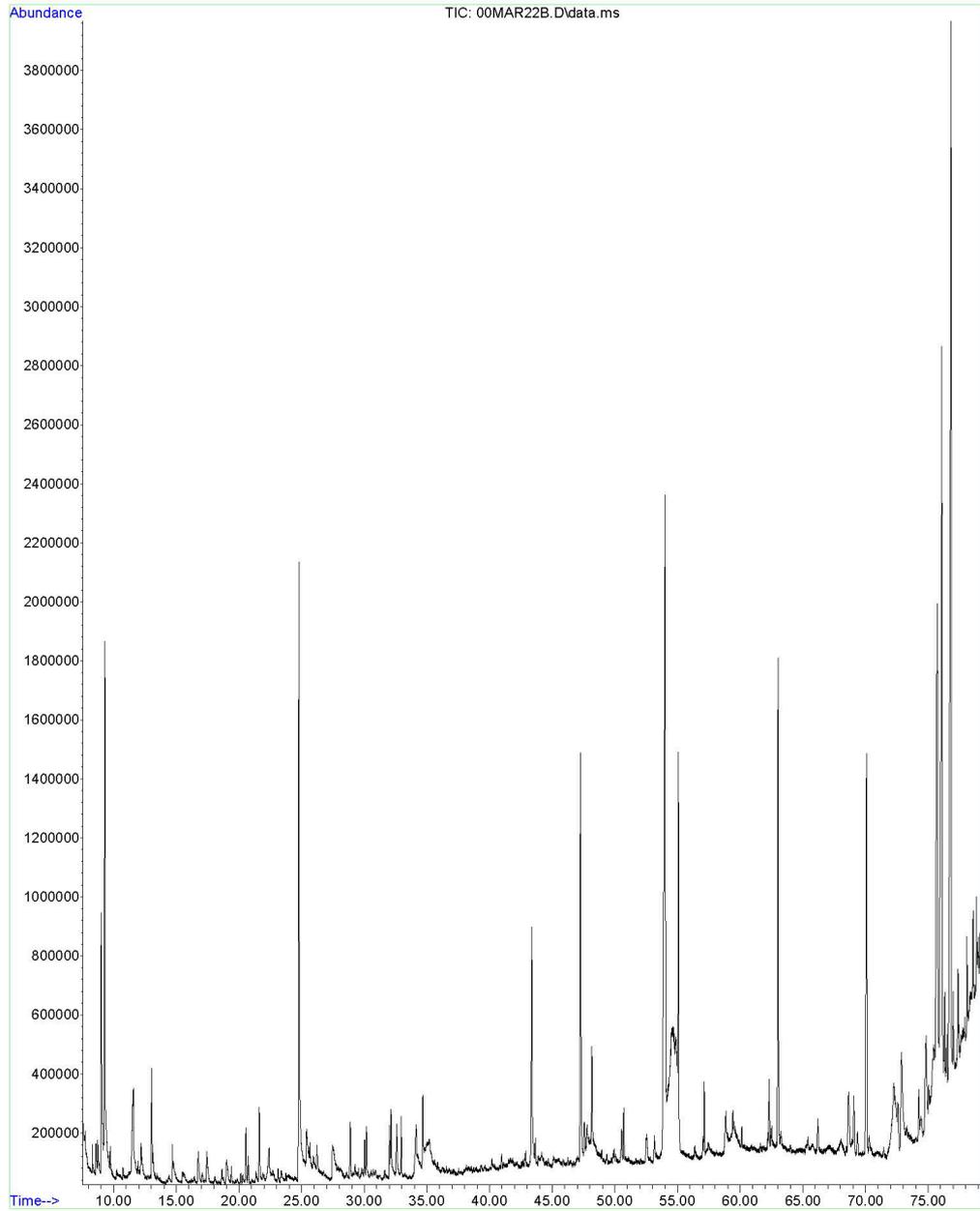


Figura 26. Cromatograma de una miel de zarzamora. Muestra Z1

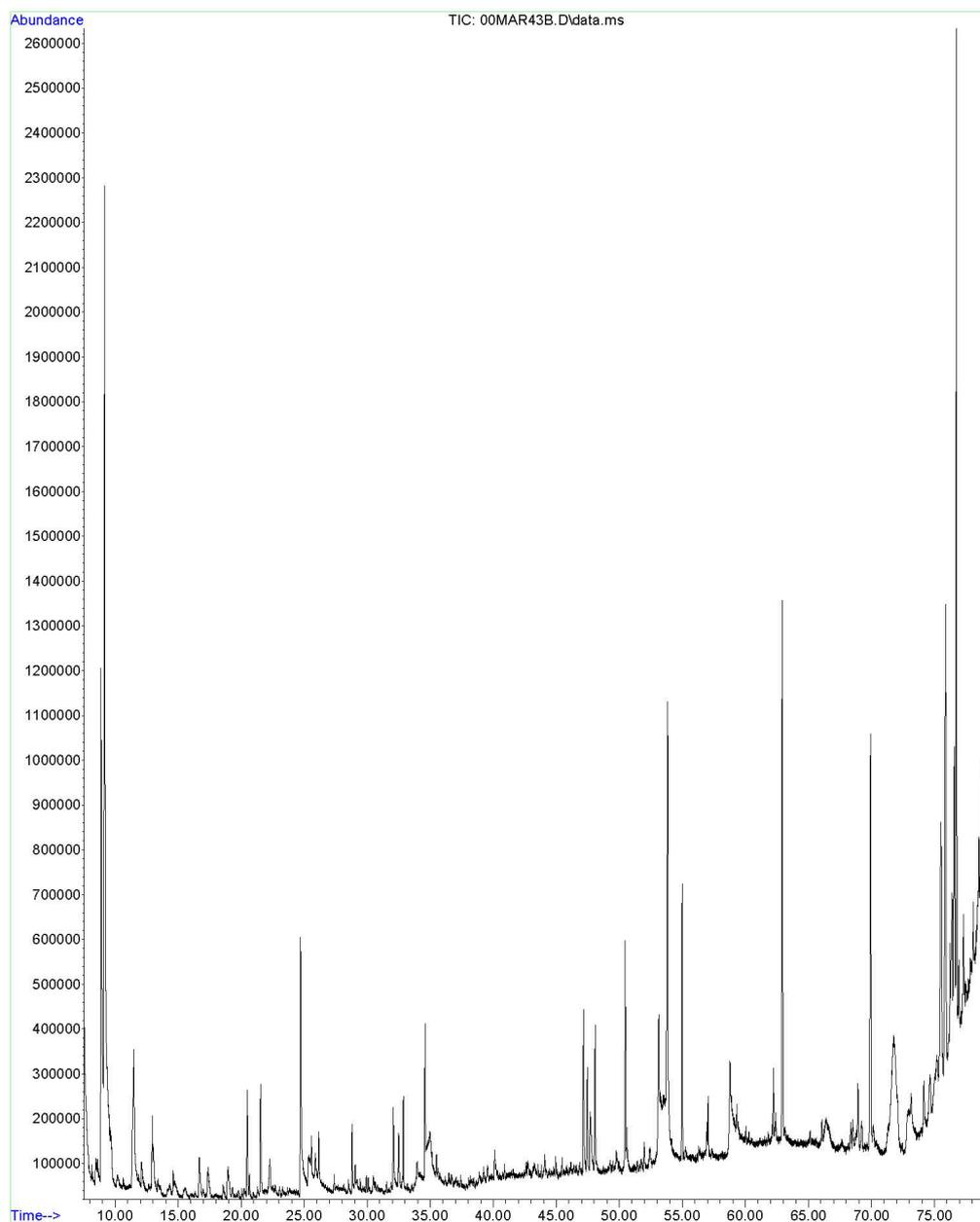


Figura 27. Cromatograma de una miel de castaño. Muestra CS1

Con el conjunto de las 30 huellas aromáticas de las mieles en estudio se ha elaborado un perfil aromático. Dicho perfil consta de 231 sustancias volátiles y semivolátiles además de los dos patrones. Como se ha indicado anteriormente, se le ha asignado un color a cada grupo para facilitar la interpretación de los resultados y se han incluido un total de 11 picos que no pudieron ser identificados, estos aparecen en el texto como desconocido de masas seguido de las masas más importantes en orden de porcentaje decreciente.

En la Tabla 6 se enumeran todos los compuestos volátiles obtenidos indicando su tiempo de retención (TR), el número de muestras en las que aparece, los valores mínimos, máximos y la media de sus concentraciones en mg/g de miel.

Tabla 6. Compuestos volátiles y semivolátiles encontrados en las 30 muestras de miel

TR	COMPUESTOS	Nº MIELES	MIN (mg/g)	MAX (mg/g)	MEDIA (mg/g)
7,57	dipropil éter	1	0,00	0,13	0,01
7,61	1-etoxibutano	2	0,00	1,29	0,14
7,70	diisopropil éter	3	0,00	0,12	0,02
7,79	3-hidroxi-2-butanona	1	0,00	0,07	0,01
7,85	3-metil-3-buten-1-ol	1	0,00	0,07	0,01
8,03	3-metoxihexano	3	0,00	0,11	0,02
8,10	1,2-propanodiol	1	0,00	0,03	0,01
8,42	metilbenceno (tolueno)	3	0,00	0,20	0,03
9,01	2,3-butanodiol (isómero 1)	28	0,00	6,71	2,07
9,34	2,3-butanodiol (isómero 2)	29	0,00	8,19	2,93
10,23	2-furancarboxaldehído (furfural)	24	0,00	3,31	0,79
10,37	ácido 3-metilbutanoico (ácido isovalérico)	4	0,00	0,49	0,03
10,62	ácido 2-metilbutanoico	2	0,00	0,20	0,01
10,72	2-furanmetanol (alcohol furfúrico)	29	0,00	2,76	0,72
11,31	3-furanmetanol	1	0,00	0,03	0,01
11,16	5-metil-2(3H)-furanona (angélica lactona)	2	0,00	0,93	0,05
11,52	2-propanol	18	0,00	8,23	1,80
12,19	1,3-dihidroxi-2-propanol	22	0,00	4,55	1,42
12,73	2-(3H)-dihidrofuranona	17	0,00	1,02	0,27
13,02	2-hidroxiciclopent-2-en-1-ona	29	0,00	8,930	2,655
13,42	ácido 3-metilpentanoico (ácido valérico)	2	0,00	2,31	0,09
13,67	3-metil-2,5-furandiona	5	0,00	0,71	0,06
14,23	5-metil-2-furancarboxaldehído	21	0,00	3,24	0,54
14,39	benzaldehído	16	0,00	1,12	0,24
14,67	2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona (isómero 1)	21	0,00	4,81	0,85
14,75	fenol	21	0,00	6,03	0,84
15,07	ácido 3-hexenoico	2	0,00	2,20	0,11
15,49	desconocido de masas 55, 84, 112, 39	10	0,00	3,96	0,43

TR	COMPUESTOS	Nº MIELES	MIN (mg/g)	MAX (mg/g)	MEDIA (mg/g)
15,80	3,3-dimetiloxetano	8	0,00	2,43	0,28
16,05	3-piridincarboxaldehído (nicotinaldehído)	5	0,00	0,53	0,04
16,40	4-isopropenil-1-metilciclohexeno (limoneno)	4	0,00	0,23	0,01
16,81	2,5-dihidrofurandiona	30	0,06	8,25	1,86
17,02	fenilmetanol (alcohol bencílico)	26	0,00	1,59	0,53
17,06	3,5,5-trimetil-3-ciclohexen-1-ona (β -isoforona)	19	0,00	11,74	0,54
17,42	2-hidroxi-3,3-dimetil- γ -butirolactona (pantolactona)	29	0,00	4,38	0,77
17,43	fenilacetaldehído	30	0,02	12,04	1,85
18,04	1-feniletanol	2	0,00	1,19	0,04
18,08	óxido de cislinalol	8	0,00	1,55	0,16
18,11	2-furancarboxilato de metilo	8	0,00	2,28	0,22
18,37	1-feniletanona (acetofenona)	16	0,00	1,97	0,24
18,63	3-hidroxi-2-metil 4H-piran-4-ona (maltol)	24	0,00	1,76	0,53
18,76	óxido de translinalol	6	0,00	5,08	0,35
19,01	furancarboxilato de metilo	21	0,00	8,14	1,33
19,33	3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol (hotrienol)	26	0,00	3,28	0,67
19,35	nonanal	21	0,00	1,49	0,17
19,72	4-hidroxi-6-metil-2H-piran-2-ona	25	0,00	1,31	0,38
20,26	2-feniletanol (alcohol fenílico)	30	0,05	6,48	1,29
20,63	3,5,5-trimetil -2-ciclohexen-1-ona (α -isoforona)	4	0,00	0,51	0,03
21,41	3-piridincarboxilato de metilo	4	0,00	2,32	0,14
21,50	fenilacetnitrilo	5	0,00	3,90	0,26
21,63	2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona (isómero 2)	30	0,18	11,89	2,85
22,02	ácido octanoico	4	0,00	2,06	0,09
22,14	acetato de bencilo	7	0,00	1,04	0,09
22,76	2,2,6-trimetil 1,4-ciclohexadiona	9	0,00	15,06	0,90
22,61	ácido benzoico	29	0,00	7,95	2,06
23,12	3,7-dimetil-1,5-octadien-3,7-diol (terpendiol)	26	0,00	5,76	1,00
23,48	3,5-dihidroxi-2-metil 4H-piran-4-ona (5-hidroximaltol)	22	0,00	8,67	1,48
23,80	1,2-bencenodiol (catecol)	23	0,00	9,86	2,03
24,75	2-3-dihidrobencofurano	30	0,12	18,27	3,98
24,91	2-5-dihidroxi-metilfurano	6	0,00	7,25	0,44
25,11	3-fenilfurano	2	0,00	0,94	0,03
25,41	5-hidroximetil-2-furancarboxaldehído (HMF)	30	0,06	12,07	3,02
25,89	2-cumaranona	3	0,00	7,13	0,40
26,16	ácido fenilacético (ácido bencenacético)	28	0,00	11,04	2,39
26,17	benzoato de metilo	5	0,00	8,56	0,41
26,20	acetato de 2-feniletilo	1	0,00	0,28	0,01
26,38	ácido nonanoico	13	0,00	2,41	0,33

TR	COMPUESTOS	Nº MIELES	MIN (mg/g)	MAX (mg/g)	MEDIA (mg/g)
26,75	4-metoxi-benzaldehído (4-anisaldehído)	5	0,00	5,83	0,33
27,52	1,4-bencenodiol (hidroquinona)	15	0,00	1,87	0,39
27,70	timol	6	0,00	1,70	0,15
27,91	4-metoxi-fenilmetanol (alcohol anisico)	4	0,00	0,52	0,03
28,33	ácido 2-hidroxibenzoico (ácido salicílico)	13	0,00	1,13	0,25
28,58	1-metoxi-4-propilbenceno (propilanisol)	24	0,00	7,21	0,83
28,85	4-vinil-2-metoxifenol	30	0,08	5,27	1,46
28,91	3-fenil-2-propenol (alcohol cinámico)	3	0,00	0,72	0,05
29,00	ácido 2-hidroxi-fenilacético (ácido mandélico)	4	0,00	0,75	0,06
29,09	3,4,5-trimetilfenol (hemimelitenol)	12	0,00	2,60	0,37
29,28	3,5,5-trimetil-4-hidroxi-2-ciclohexen-1-ona	1	0,00	5,07	0,17
29,29	desconocido de masas 59, 60, 43, 69, 41, 118	8	0,00	8,74	0,49
29,51	triacetato de 1,2,3-propanotriol (triacetina)	2	0,00	0,53	0,03
29,67	3-metoxiacetofenona	3	0,00	0,32	0,02
29,84	ácido 3-fenilpropanoico	13	0,00	2,37	0,34
30,12	2,6-dimetil-2,7-octadien-1,6-diol	1	0,00	0,39	0,01
30,54	3-hidroxi-4-fenil-2-butanona	7	0,00	5,05	0,43
30,57	ácido decanoico	8	0,00	4,19	0,30
30,72	1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno	8	0,00	3,42	0,39
31,01	2-metoxi-4-(2-propenil) fenol (eugenol)	4	0,00	0,77	0,06
31,39	2-hidroxi-3-fenilpropanoato de metilo	2	0,00	0,63	0,03
31,49	4-hidroxibenzoato de metilo	2	0,00	0,31	0,01
31,63	derivado del ácido cinámico	4	0,00	0,63	0,05
32,04	3,7-dimetil-oct-1-en-3,6,7-triol/ Isómero 1	7	0,00	1,37	0,14
32,14	3,7-dimetil-oct-1-en-3,6,7-triol/ Isómero 2	11	0,00	7,09	0,66
32,55	2- metilindol	6	0,00	2,32	0,24
32,92	undecanoato de metilo	30	3,04	3,04	3,04
33,02	1,2,3,4-tetrahidro-4,5,7-trimetil-1-naftol	4	0,00	3,04	0,17
33,24	1-fenil-2-butanol	9	0,00	5,37	0,43
33,35	acetato de anisilo	3	0,00	0,88	0,06
33,57	desconocido de masas 65, 93, 121, 66 ,145, 149	3	0,00	1,66	0,10
33,91	desconocido de masas 133, 162, 118, 89, 77, 63	11	0,00	6,82	1,00
33,95	ácido 4-metoxibenzoico	3	0,00	1,09	0,05
34,04	desconocido de masas 107, 136, 77, 164	9	0,00	3,36	0,49
34,14	ácido 3-fenil-2-propenoico (ácido cinámico)	21	0,00	8,57	1,61
34,25	1 etil-3-1-metiletilbenceno (etilcumeno)	1	0,00	4,96	0,17
34,23	4-hidroxi-metilfenol	3	0,00	1,98	0,12
34,55	acetato de 3-fenil-2-propen-1-ol (acetato de cinamilo)	3	0,00	1,43	0,06
34,57	desconocido de masas 136, 89, 90, 107	5	0,00	1,69	0,09

TR	COMPUESTOS	Nº MIELES	MIN (mg/g)	MAX (mg/g)	MEDIA (mg/g)
34,63	desconocido de masas 266, 251, 252, 133, 267, 253	28	0,00	4,77	1,90
34,72	2-metoxi-4-propenilfenol (isoeugenol)	7	0,00	2,63	0,34
34,78	ácido undecanoico	5	0,00	3,02	0,28
35,16	2,3-dihidro-2-metilbenzofurano	1	0,00	5,67	0,19
35,30	2-cianoquinolina	12	0,00	5,00	0,69
35,42	2-(hidroxi-4-metilfenil) etanona (2-hidroxi-4-metilacetofenona)	8	0,00	5,19	0,48
35,83	5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4H-piran-4-ona (ácido kójico)	4	0,00	4,62	0,23
35,82	pentadecano	10	0,00	0,53	0,09
36,40	desconocido de masas 123, 168, 153, 107, 67, 125, 95	1	0,00	3,78	0,13
36,71	delta decalactona	2	0,00	1,92	0,08
36,73	ácido 4 metoxifeindinilacético- (ácido homoanísico)	4	0,00	0,92	0,07
36,76	3-cromanona	4	0,00	0,59	0,06
36,94	3,4,-dimetoxifenilmetanol (veratril alcohol)	1	0,00	0,05	0,01
36,94	3,3,5-trimetil-4-(2-acetiletil)-4,5 epoxi-ciclohexanol	7	0,00	1,24	0,11
37,03	2-etoxi-4-metoxibenzaldehído	4	0,00	2,32	0,15
37,12	3,4-dietil-2-metoxipiridina	5	0,00	2,43	0,24
37,49	desconocido de masas 105, 147, 120, 119, 91, 204, 133	14	0,00	7,24	1,15
37,71	ácido 10-hidroxidecanoico	7	0,00	1,52	0,17
37,95	ácido 2-hidroxifenilpropanoico (ácido 3-fenil-láctico)	8	0,00	10,94	1,54
37,95	ácido 4 hidroxibenzoico	4	0,00	1,27	0,09
38,07	1-metilisoquinolona	2	0,00	4,19	0,17
38,17	2-metoxi-4-metoximetilfenol	3	0,00	0,79	0,03
38,24	4-isopropilbenzaldehído	7	0,00	4,77	0,61
38,28	3,4-dimetoxifenilpropanoato de metilo	4	0,00	2,93	0,19
38,76	ácido dodecanoico (ácido láurico)	13	0,00	6,62	0,62
38,93	4-metoxibenzoato de metilo (p-anisato de metilo)	3	0,00	6,24	0,15
38,96	4-fenil-2-butenato de metilo	5	0,00	5,09	0,24
39,10	2-hidroxifenilpropanoato de metilo	2	0,00	14,30	0,83
39,22	4-dimetilaminobenzaldehído	1	0,00	0,43	0,01
39,30	1-trideceno (1-tridecanol)	5	0,00	4,47	0,30
39,34	megastigmatrienona (isómero 1)	1	0,00	0,88	0,03
39,38	3,4-dimetoxi-feniletanona (3,4-dimetoxiacetofenona)	1	0,00	1,54	0,05
39,66	ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico (ácido vanílico)	7	0,00	3,29	0,17
39,82	3-(4-hidroxi-fenil)-propanol	1	0,00	0,88	0,03
40,20	4-metoxifenilacetato de metilo	22	0,00	17,35	2,01
41,69	ácido 4 hidroxifenilacético	2	0,00	3,89	0,14
41,69	megastigmatrienona (isómero 2)	2	0,00	0,20	0,01
41,83	desconocido de masas 43, 192, 38, 67, 95, 179, 109, 123, 135, 152, 207	6	0,00	4,91	0,26

TR	COMPUESTOS	Nº MIELES	MIN (mg/g)	MAX (mg/g)	MEDIA (mg/g)
42,08	megastigmatrienona (isómero 3)	2	0,00	0,94	0,03
42,36	4-(4-metoxifenil)-butan-2-ona (anisil acetona)	3	0,00	16,50	0,58
42,62	3-oxo- α -ionol	7	0,00	4,59	0,27
42,66	4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-butanona (zingeronona)	1	0,00	0,09	0,01
42,67	2-4-dimetil-indanil-acetato	11	0,00	4,91	0,43
42,76	mentofurano	5	0,00	3,31	0,22
42,82	4-(etoximetil)-2-metoxifenol	14	0,00	3,06	0,52
42,84	1- heptadeceno - C 17 ENO 1	1	0,00	0,12	0,01
43,03	3,4,5-trimetoxifenilmetanol	1	0,00	1,23	0,04
43,18	1-heptadeceno - C 17 ENO 2	3	0,00	1,56	0,07
43,28	4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído (siringaldehído)	8	0,00	1,86	0,27
43,60	heptadecano - C17 ANO	21	0,00	3,99	0,56
43,91	desconocido de masas 149, 164, 93, 121, 136, 41, 90	9	0,00	5,02	0,49
43,94	2-pentadecanona - C15 ONA	2	0,00	0,11	0,01
44,07	octadecadienal	3	0,00	2,58	0,14
44,14	(3E, 1'R*,2'S*, 5'R*)-4-(5'hidroxi-2',6' 6'-trimetil-1',2'-epoxi-1-ciclohexil-3-butan-2-ona	2	0,00	0,37	0,01
44,34	2-hidroxi- β -ionona	5	0,00	19,07	1,07
44,46	2,3-dihidro-3,3,4,7-tetrametil-1H-inden-1-ona	4	0,00	1,37	0,10
44,83	α -gurjuneno	4	0,00	2,28	0,22
45,05	1,4-dimetoxi-2-(metiltio)benceno	1	0,00	0,23	0,01
45,20	6,7-dehidro-7,8-dihidro-3-oxo- α -ionol (isómero 1)	6	0,00	0,89	0,08
45,40	ácido 4-metoxicinámico	2	0,00	0,06	0,00
46,07	4'-hidroxi-3',5'-dimetoxiacetofenona (acetosiringona)	1	0,00	0,22	0,01
45,94	4-hidroxi-3-metoxifenilacetato de metilo (homovanillato de metilo)	15	0,00	5,40	0,38
46,23	ácido tetradecanoico (ácido mirístico)	10	0,00	2,51	0,22
46,66	octadeceno - C18 ENO 1	2	0,00	0,82	0,05
47,21	3,4,5-trimetoxibencil metil éter	19	0,00	6,26	1,32
47,35	3,4-dimetoxifenilacetato de metilo	4	0,00	15,24	0,83
47,60	degradado de carotenoide masas 43, 123, 209, 163, 77, 107, 149	2	0,00	0,12	0,01
47,41	6,7-dehidro-7,8-dihidro-3-oxo- α -ionol (isómero 2)	3	0,00	4,31	0,18
48,23	4-hidroxi-4-(3-oxo-1-butenil) -3,5,6-trimetilciclohex-2-en-1-ona (dehidrovomifoliol)	30	0,16	17,55	2,57
48,73	desconocido de masas 172, 155, 128, 101, 75, 117	7	0,00	2,35	0,22
48,92	2-hexadecanona - C16 ONA	1	0,00	0,07	0,01
49,62	3-formil indol	1	0,00	0,16	0,01
50,17	2-hidroxi-4-metoxifenilacetato de metilo (4-metoxi-mandelato de metilo)	9	0,00	15,84	1,76
50,40	nonadeceno - C19 ENO 1	2	0,00	1,11	0,06
50,43	nonadeceno - C19 ENO 2	5	0,00	1,00	0,10

TR	COMPUESTOS	Nº MIELES	MIN (mg/g)	MAX (mg/g)	MEDIA (mg/g)
50,67	nonadecano - C19 ANO	27	0,00	15,85	1,88
51,02	heptadecanona - C17 ONA	2	0,00	0,25	0,01
52,53	(3S*,5R*,6R*,7E,9)-3,6-Epoxy-7-megastigmen-5,9-diol.	12	0,00	5,38	0,92
53,14	ácido hexadecanoico (ácido palmítico)	25	0,00	9,98	2,08
53,78	eicoseno - C20 ENO 1	5	0,00	13,00	0,78
53,84	eicoseno - C20 ENO 2	1	0,00	0,53	0,02
53,92	eicosano - C20 ANO	8	0,00	8,10	0,96
53,97	(E)-4-r-1', t-2', c-4'-trihidroxi-3',6',6'-trimetilciclohexilbut-3-en-2-ona	24	0,00	36,77	6,00
54,40	7-hidroxi-6-metoxi 2H-1-benzopiran-2-ona (escopoletina)	1	0,00	0,13	0,00
55,03	heptadecanoato de metilo	30	0,17	15,67	4,32
55,61	acetato de metilindol	1	0,00	1,47	0,05
56,32	derivado del 8-quinolinol	6	0,00	8,78	0,69
56,78	hidrocarburo con 21 átomos de carbono - C21 ENO 1	11	0,00	2,14	0,32
56,99	hidrocarburo con 21 átomos de carbono - C21 ENO 2	17	0,00	3,13	0,42
57,09	hidrocarburo con 21 átomos de carbono - C21 ANO	29	0,00	16,70	2,42
58,82	ácido 9-octadecenoico (ácido oleico)	22	0,00	9,02	1,95
59,43	ácido linoleico	9	0,00	5,16	0,56
59,49	ambrettolide	4	0,00	9,22	0,42
60,08	hidrocarburo con 22 átomos de carbono - C22 ANO	25	0,00	4,45	0,73
60,81	hidrocarburo con 20 átomos de carbono - C20 ONA	1	0,00	1,68	0,06
62,18	9,12- octadecadienoato de metilo/linoleato de metilo	14	0,00	4,70	0,39
62,27	hidrocarburo con 23 átomos de carbono - C23 ENO 1	27	0,00	6,62	1,56
62,46	hidrocarburo con 23 átomos de carbono - C23 ENO 2	18	0,00	7,07	0,91
62,98	hidrocarburo con 23 átomos de carbono - C23 ANO	27	0,00	40,84	4,60
64,73	totalol	1	0,00	0,18	0,01
66,13	hidrocarburo con 24 átomos de carbono - C24 ENO 1	23	0,00	7,13	1,11
66,68	hidrocarburo con 24 átomos de carbono - C24 ENO 2	3	0,00	2,04	0,09
68,56	pinostrobin chalcona	28	0,00	4,93	1,23
69,03	hidrocarburo con 25 átomos de carbono - C25 ENO 1	26	0,00	5,61	1,90
69,29	hidrocarburo con 25 átomos de carbono - C25 ENO 2	20	0,00	6,41	0,89
70,02	hidrocarburo con 25 átomos de carbono - C25 ANO	27	0,00	22,96	4,69
70,23	hidrocarburo con 23 átomos de carbono - C23 ONA	26	0,00	5,92	1,73
71,78	hidrocarburo con 26 átomos de carbono - C26 ENO 1	9	0,00	15,07	1,08
72,39	hidrocarburo con 26 átomos de carbono - C26 ENO 2	9	0,00	20,89	2,31
72,86	pinocembrina	25	0,00	9,92	2,46
74,21	hidrocarburo con 26 átomos de carbono - C26 ANO	26	0,00	7,35	1,21
74,99	hidrocarburo con 27 átomos de carbono - C27 ENO 1	18	0,00	6,18	1,61
74,99	hidrocarburo con 27 átomos de carbono - C27 ENO2	7	0,00	1,75	0,16

TR	COMPUESTOS	Nº MIELES	MIN (mg/g)	MAX (mg/g)	MEDIA (mg/g)
75,59	hidrocarburo con 27 átomos de carbono - C27 ANO	29	0,00	63,65	6,65
75,93	tectocrisina	5	0,00	22,94	1,03
75,96	hidrocarburo con 28 átomos de carbono - C28 ENO 1	24	0,00	29,91	6,18
76,28	hidrocarburo con 28 átomos de carbono - C28 ENO 2	28	0,00	6,15	2,68
76,61	hidrocarburo con 28 átomos de carbono - C28 ANO	25	0,00	17,38	3,39
76,79	hidrocarburo con 29 átomos de carbono - C29 ENO 1	28	0,00	23,35	7,17
76,98	1-eicosanol - C29	28	0,00	4,75	2,38
77,35	hidrocarburo con 29 átomos de carbono - C29 ANO	30	0,08	5,89	1,72
77,53	hidrocarburo con 30 átomos de carbono - C30 ENO1	5	0,00	1,20	0,12
78,18	crisina	8	0,00	2,76	0,37
78,43	neofitadieno	1	0,00	4,73	0,16
78,55	hidrocarburo con 30 átomos de carbono - C30 ENO 2	27	0,00	7,78	2,34
78,84	hidrocarburo con 30 átomos de carbono - C30 ANO	17	0,00	8,77	1,64
79,04	apigenina	10	0,00	2,05	0,29
79,09	hidrocarburo con 31 átomos de carbono - C31 ENO 1	8	0,00	4,04	0,41

4.1. COMPUESTOS ALIFÁTICOS (76 compuestos)

En nuestro estudio este grupo representa un 32,9 % del total de los compuestos analizados. Los compuestos alifáticos de cadena corta, aparecen a tiempos de retención inferiores a 16 minutos, aunque son importantes para determinar la autenticidad de miel de lavanda y brezo (Falcão et al., 2017), en nuestro estudio estos compuestos de cadena corta como el dipropil éter solo aparece en la miel BQ1. Como posible marcador floral señalaremos el 1-etoxibutano ya que solo aparece en las dos mieles de bosque. El diisopropil éter y el 3-metoxihexano son los únicos compuestos que se encuentran en las tres mismas mieles, las 2 de bosque (BQ1 y BQ2) y en la V3 de viborera. Entre los compuestos alifáticos de cadena larga, con tiempos de retención superiores a 50 minutos, hay que destacar la presencia de hidrocarburos con un elevado número de átomos de carbono. El rango del detector de masas utilizado (de 30 a 300 m/z) no nos permitió, con solo ver el espectro, identificar los hidrocarburos detectados, pero observamos que los tiempos de retención de alcanos, alquenos y cetonas presentan relaciones lineales frente al número de átomos de carbono como se muestra en las Figura 30, 31 y 32 por lo que hemos usado las ecuaciones de estas rectas para estimar el número de átomos de carbono de los picos que salen a tiempos superiores.

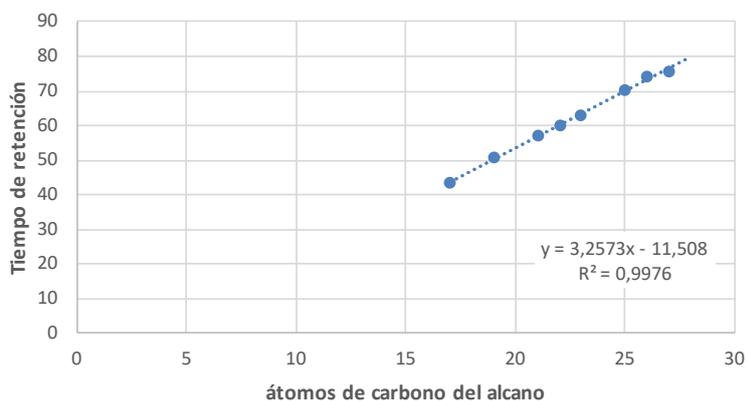


Figura 28. Gráfica tiempo de retención de los distintos alcanos, frente a los átomos de carbono de su estructura

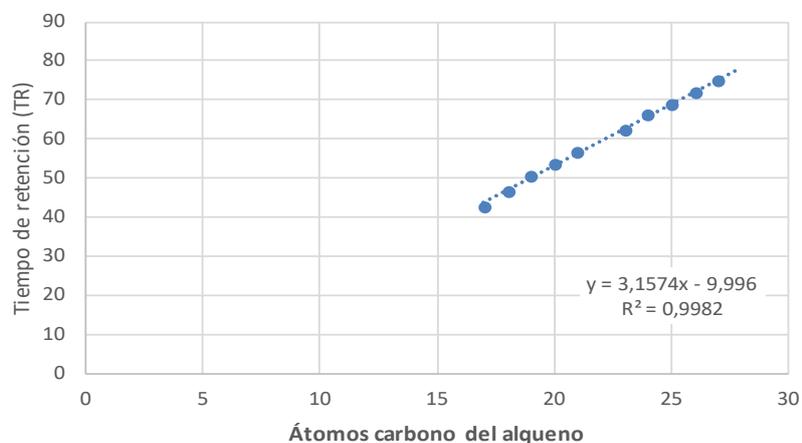


Figura 29. Gráfica tiempo de retención de los distintos alquenos, frente a los átomos de carbono de su estructura

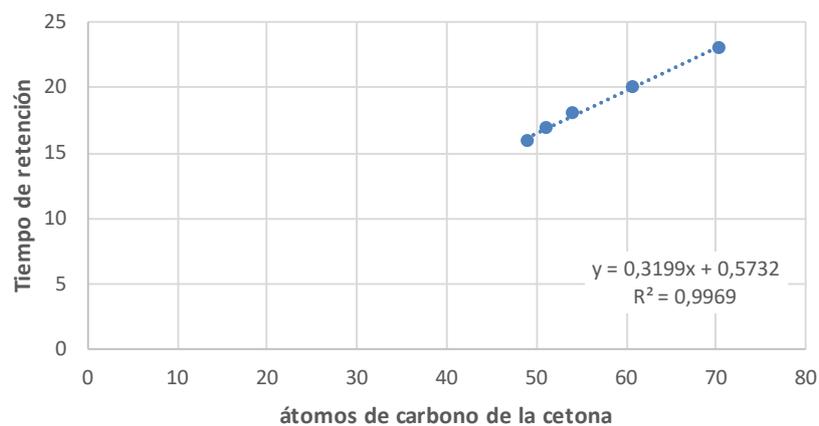


Figura 30. Gráfica tiempo de retención de las distintas cetonas, frente a los átomos de carbono de su estructura

Entre los alcanos y alquenos, los hidrocarburos de alto peso molecular son los que encontramos a mayores concentraciones, destacando los alcanos entre 19 y 29 átomos de carbono. Muchos de ellos pueden proceder de las ceras con lo que limita su relación con el origen botánico de las mieles. En la Tabla 7 se reflejan las máximas concentraciones de cada uno de los hidrocarburos alifáticos de 19 a 29 carbonos, que obtienen una máxima concentración superior a 10 mg/g, así como las muestras en que se han detectado esas concentraciones.

Tabla 7. Máximas concentraciones de hidrocarburos de alto peso molecular

Hidrocarburos de 19 carbonos - C19 ANO	15,85 mg/g , en la miel BR2
Hidrocarburos de 20 carbonos - C20 ENO 1	13 mg/g , en la miel A3
Hidrocarburos de 21 carbonos - C21 ANO	16,70 mg/g , en la miel BR2
Hidrocarburos de 23 carbonos - C23 ANO	40,84 mg/g , en la miel V2
Hidrocarburos de 25 carbonos - C25 ANO	22,96 mg/g , en la miel BR2
Hidrocarburos de 26 carbonos - C26 ENO 1	15,07 mg/g , en la miel ML3
Hidrocarburos de 26 carbonos - C26 ENO 2	20,89 mg/g , en la miel ML4
Hidrocarburos de 27 carbonos - C27 ANO	63,65 mg/g , en la miel ZR1
Hidrocarburos de 28 carbonos - C28 ENO 1	29,91 mg/g , en la miel ML3
Hidrocarburos de 28 carbonos - C28 ANO 1	17,38 mg/g , en la miel V1
Hidrocarburos de 29 carbonos - C29 ENO 1	23,35 mg/g , en la miel V1

Dentro de los alcoholes es importante destacar la presencia de 2,3-butanodiol en 27 de las 30 muestras analizadas. Solo está ausente en 2 muestras de miel de milflores (ML1 y ML2) y una de miel de viborera (V1), la máxima concentración del isómero 1 se encuentra en las mieles de mielada con un valor medio de 4,97 mg/g. En otros estudios, las mieles de mielada también han destacado por su abundancia en compuestos como el 2,3-butanodiol (Munera, 2021). Algunos alcoholes como el 2-metil-1-propanol se ha podido asociar a variedades específicas de miel de bosque (Munera, 2021). En nuestro estudio este compuesto no ha sido detectado, aunque si se ha identificado y cuantificado el 2-propanol que aparece en 18 mieles pertenecientes a todos los orígenes botánicos excepto en las de bosque y la de cuernecillo.

Entre los aldehídos, el nonanal aparece en todos los orígenes botánicos, pero solo se encuentra en una de las cinco mieles de brezo (BR1). La máxima concentración media de este compuesto es para las mieles de viborera con un valor de 0,44 mg/g.

Dentro de las cetonas, la 3-hidroxi-2-butanona aparece solo en las dos mieles de bosque, en nuestras de mieles de mielada no está presente a diferencia de lo expuesto en el estudio llevado a cabo por Soria et al. (2005). La 2-hidroxi-ciclopent-2-en-1-ona, sin embargo, la

hemos identificado en todas las mieles excepto en la M2, de mielada. La máxima concentración de este compuesto se ha obtenido en las mieles de brezo, con un valor medio de 4,45 mg/g. La 2- pentadecanona sólo se ha encontrado en dos muestras dentro de las mieles de milflores la ML1 y ML7.

En cuanto a las lactonas, la pantolactona está presente en todas las muestras, salvo en la ML2, mientras que la delta-decalactona aparece solo en dos muestras de miel de distintos orígenes botánicos, la ML4 y la A2.

Dentro de los ácidos, el ácido 3-hexenoico solo aparece en 2 mieles de brezo (BR4 y BR5), el ácido octanoico en 2 mieles de viborera (V3 y V5) y 2 de aliaga (A1 y A2). En nuestro estudio se observa la presencia de ácido decanoico en 8 muestras de todos los orígenes botánicos, salvo en las de brezo, por lo que nuestros datos difieren de otros estudios en los que se ha detectado este ácido en las mieles de brezo analizadas (Machado et al., 2020). El ácido 10-hidroxidecanoico se ha identificado en 7 muestras, 2 de milflores (ML4 y ML6), 2 de viborera (V4 y V5), 2 de aliaga (A1 y A2) y una de bosque (BQ1), alcanzando su máxima concentración en las de aliaga (1,52 mg/g). Del ácido dodecanoico (ácido láurico), destaca la elevada concentración en las dos mieles de brezo en las que se ha detectado (en BR3 a 5,63 mg/g y en BR4 a 6,62 mg/g) respecto a las mieles de los otros orígenes botánicos. Sáenz y Gómez (2000) y Sabatini (2007) describen el ácido pentadecanoico como característico de mieles. Sin embargo, en nuestro estudio no se detectó este ácido. El que sí se detectó en 10 muestras fue el ácido tetradecanoico (ácido mirístico). El espectro de masas de alguno de estos picos coincidió al 99% con el espectro del ácido tetradecanoico de la librería de espectros usada en la identificación. El ácido hexadecanoico (ácido palmítico) y el ácido 9-octadecenoico (ácido oleico), están presentes en mayor número de mieles, pero lo más importante es resaltar la presencia de ácido palmítico en todas las mieles de brezo y en tres de ellas a una concentración más elevada que en el resto de las mieles. Por último, indicar que el ácido linoleico, solo se ha identificado en una de las mieles de brezo (BR5), a una concentración intermedia entre los valores medios observados en las mieles milflores (3,76 mg/g), y la miel de castaño (5,16 mg/g).

4.2. DERIVADOS DEL BENCENO (69 compuestos)

La formación de los derivados del benceno se debe principalmente a transformaciones físico-químicas de diversos compuestos, por acción de levaduras y bacterias (Clara y Quijano, 2004). Su aparición es muy frecuente en mieles de diferentes orígenes botánicos y geográficos, siendo este su principal inconveniente para utilizarse como marcadores, ya que solo podrían usarse como marcadores si alguno de ellos mostrase una concentración muy diferente en un tipo de miel con respecto a los demás. En nuestro estudio este grupo de compuestos representan el 29,9% del total de componentes aromáticos encontrados. Dentro de este grupo de compuestos, es muy habitual encontrarse con derivados del benceno

sustituídos en posición 4, muchos de estos compuestos se forman a partir de la ruta del ácido shikímico.

Alcoholes: el fenol aparece en todos los orígenes botánicos, excepto en mieles de viborera y bosque, la máxima concentración media (1,80 mg/g) se dio en las mieles de brezo. El fenilmetanol (alcohol bencílico), se encuentra en todos los orígenes botánicos, excepto en la miel de cuernecillo (CU1). Estos datos son concordantes de los de otros estudios en los que se concluyó que el alcohol bencílico es un componente de casi todos los tipos de miel analizados (Machado et al., 2020). En mieles de brezo presenta valores superiores al de otros orígenes botánicos por lo que sería un posible marcador de este tipo de mieles. El 1-feniletanol, que en otros estudios se ha identificado como un poderoso marcador de la miel de castaño (Alissandrakis et al., 2011), en nuestro trabajo solo se ha encontrado en dos mieles; en la ML2 y en la CU1, pero no en la miel de castaño. El 2-feniletanol (alcohol feniletílico), aparece en las 30 muestras, su máxima concentración media se da en las mieles de brezo (2,31 mg/g) aunque destacamos que su máxima concentración individual se ha obtenido en la miel de milflores ML2 (6,48mg/g). El 1,2-bencenodiol (catecol) y el 1,4-bencenodiol (hidroquinona) se han identificado en todos los orígenes botánicos salvo en la miel de cuernecillo (CU1). El 4-metoxifenilmetanol (alcohol anisico), solo aparece en 4 muestras, cuantificándose a muy baja concentración en las dos mieles de bosque. El 4-vinil-2-metoxifenol, es otro de los compuestos derivados del benceno que se ha identificado en todas las muestras, cabe destacar que en las mieles de brezo la concentración media es notablemente superior (3,19 mg/g) al resto de los orígenes botánicos. El 3-fenil-2-propenol (alcohol cinámico), solo ha aparecido en tres orígenes botánicos y su mayor concentración se ha detectado en la miel de castaño (0,72 mg/g). El 3,4,5-trimetilfenol (hemimelitenol) no ha sido detectado en ninguna miel de trébol, de bosque ni en la de castaño. El 2-metoxi-4-(2-propenil) fenol (eugenol) tan solo se ha encontrado en 4 muestras y dos orígenes botánicos: brezo y aliaga. El 1-fenil-2-butanol, está presente en 9 mieles y ausente en las de trébol, bosque, mielada, aliaga y en la de zarzamora. El 4-hidroximetilfenol solo aparece en 3 mieles de viborera (V1, V4 y V5). El 2-metoxi-4-propenilfenol, (isoeugenol), no se ha encontrado en ninguna miel milflores. El 3,4-dimetoxifenilmetanol (veratril alcohol), aparece solamente en una miel de bosque (BQ2). El 2-metoxi-4-metoximetilfenol lo hemos detectado en 3 mieles, 2 de viborera (V3 y V4) y en una de aliaga, la A1. El 3-(4-hidroxifenil)-propanol tan solo se ha encontrado en la muestra ML4. El 4-(etoximetil)-2-metoxifenol se ha detectado en la mitad de las muestras y no aparece en las de bosque, cuernecillo y zarzamora. Por último, indicaremos que el 3,4,5-trimetoxifenilmetanol solo aparece en la muestra V5.

Aldehídos: el benzaldehído aparece en 16 muestras y destacaremos su ausencia en las mieles de trébol. El fenilacetaldehído se ha encontrado en las 30 mieles, las mayores concentraciones medias se han detectado en mieles de brezo (2,54 mg/g) y milflores (2,50 mg/g) y destacamos la elevada concentración de este compuesto en la muestra ML2 (12,04

mg/g) comparado con el resto de mieles. El 4-metoxibenzaldehído (4-anisaldehído), aparece tan solo en 5 mieles, resaltando su elevada concentración en la BR2 (5,83 mg/g) y en la CS1 (3,23 mg/g). En estas mismas mieles también es elevada la concentración del 4-isopropilbenzaldehído (4,77 mg/g y 3,98 mg/g, respectivamente). El 2-etoxi-4-metoxibenzaldehído, solo se ha cuantificado en 4 mieles de diversos orígenes botánicos. El 4-dimetilaminobenzaldehído, solo se ha detectado en una miel BQ1 de bosque y el 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído (siringaldehído) se encuentra en 8 muestras y nos aparece en las mieles de mielada, bosque, cuernecillo y castaño.

Cetonas:

- Derivadas de la fenil-etanona (acetofenona) la 1-feniletanona (acetofenona), aparece en todos los orígenes botánicos analizados excepto en las mieles de viborera, de mielada y de zarzamora. La acetofenona ha sido propuesta como marcador floral de la miel de castaño (Guyot et al., 1998; Alissandrakis et al., 2011), sin embargo, en nuestro estudio los valores de este compuesto en la miel de castaño son similares a algunas mieles de otros orígenes botánicos. La 2-hidroxi-4-metilfeniletanona (p-anisol), aparece de forma casi exclusiva en las mieles de brezo y a una elevada concentración media (1,70 mg/g). La 3-metoxi-1-feniletanona (3-metoxiacetofenona) solo aparece en 2 mieles de aliaga (A1 y A3) y en la BQ1. La 3,4-dimetoxiacetofenona solo se ha encontrado en la miel V2. Por último, la 4-hidroxi-3,5-dimetoxiacetofenona (acetosiringona) ha sido cuantificada en la miel BQ1 a baja concentración (0,22 mg/g).
- Derivados de la fenil-butanona: La 3-hidroxi-4-fenil-2-butanona, aparece en 7 mieles y 3 orígenes botánicos, destaca su presencia en todas las mieles de brezo excepto en la BR1 y su máxima concentración se ha cuantificado en la BR4 (5,05 mg/g). La 4-metoxi-4-fenil-2-butanona (anisil acetona), prácticamente ausente en todas las muestras, pero se ha detectado a una elevada concentración en la muestra BR2 (16,50 mg/g). La 4-hidroxi-3-metoxifenil-2-butanona (zingerona), sólo aparece en la muestra ML7 a una baja concentración (0,08mg/g).

Ácidos libres y sus ésteres:

- Derivados del ácido benzoico: el ácido benzoico, se ha identificado en 29 muestras, destacando su elevada concentración en la miel ML2 de milflores (7,53 mg/g), en la miel de castaño (7,55 mg/g) y en la muestra BR5 (7,95 mg/g), respecto al resto de mieles. También se ha detectado benzoato de metilo en 5 muestras, la ML6, A3, M1, BQ2 y CS1. El ácido 2-hidroxibenzoico (ácido salicílico) se ha encontrado en todos los orígenes botánicos salvo en la miel de cuernecillo y la de zarzamora y la máxima concentración media se ha obtenido en las mieles de brezo (0,59 mg/g). El 4-hidroxibenzoato de metilo, aparece tan solo en 2 mieles, la T1 y la BQ1. El ácido 4-metoxibenzoico se encuentra en 3 mieles, la M1, la BQ1 y la CS1. El ácido 4-hidroxibenzoico en 4 mieles de 4 orígenes botánicos (ML7, V5, T1 y A2). El 4-metoxi-

benzoato de metilo fue detectado en 3 mieles, la ML2, la M1 y la CS1, donde consigue su máxima concentración (6,24 mg/g). Finalmente, indicar que el ácido 4 hidroxí-3-metoxibenzóico (ácido vanílico) está ausente en todas las mieles de brezo.

- Derivados del ácido fenilacético: además del ácido fenilacético, que se ha encontrado en todas las mieles salvo en la T3 y CS1, se han detectado entre otros el ácido 2-hidroxifenilacético (ácido mandélico) en cuatro muestras la ML6, M1, BQ1 y CS1, el ácido 4-hidroxifenilacético, que solo se ha encontrado en la miel ML2 y en la CU1 y el ácido 4-metoxifenilacético (ácido homoanísico), presente en 4 muestras, la ML2, la V3, la de cuernecillo y la de castaño. El 4-metoxifenilacetato de metilo destaca por su elevada concentración media en las mieles de brezo (6,56 mg/g) y su ausencia en las muestras de bosque. El 4-hidroxí-3-metoxifenilacetato de metilo aparece en 15 muestras y prácticamente en todos los orígenes botánicos. El 2-hidroxí-4-metoxifenilacetato de metilo (4-metoximandelato de metilo) se ha detectado en 9 mieles y 4 orígenes botánicos, milflores ML1 y ML2, aliaga A2 y A3, mielada M1 y brezo BR2, BR3 y BR4, en la BR2 destaca su elevada concentración (15,84 mg/g). El 3,4 dimetoxifenilacetato de metilo se ha identificado en la miel ML2 y en las mismas tres mieles de brezo (BR2, BR3 y BR4), siendo en la muestra BR2 donde se ha detectado su máxima concentración (15,23 mg/g).
- Derivados del ácido 3 fenil propanoico: el ácido 3 fenilpropanóico aparece en 13 muestras de diversos orígenes botánicos y su máxima concentración se ha obtenido en la miel BR2. El 2 hidroxifenilpropanoato de metilo, se ha detectado en 2 mieles de este origen (BR2 y BR5) y a una elevada concentración 10,46 mg/g y 14,29 mg/g, respectivamente. El ácido 3 fenil-2-propenoico (ácido cinámico) se ha encontrado en todos los orígenes botánicos, pero con la máxima concentración media en las mieles de aliaga (3,27 mg/g), seguida por las mieles de brezo (2,76 mg/g). Este ácido se ha propuesto como marcador destacado de las mieles de brezo, junto con el ácido trans cinámico (Guyot et al., 1999). El ácido 2-hidroxifenilpropanoico (ácido 3-fenil-láctico), fue detectado en elevadas concentraciones en mieles de casi todos los orígenes botánicos, alcanzando su máximo valor (10,94 mg/g) en la BR4. El 3,4-dimetoxi-3-fenilpropanoato de metilo se ha identificado en 4 muestras y su máxima concentración (2,93 mg/g) también se ha cuantificado en una miel de brezo, la BR1.
- Derivados del ácido fenil butanoico: 4 fenil-2-butenoato de metilo, aparece en 5 mieles, la V3, la A1, la BQ1 y en dos de brezo, la BR1 y BR3 donde se obtienen las mayores concentraciones 1,63 mg/g y 5,08 mg/g respectivamente.
- Acetatos: El acetato de bencilo está presente en 7 mieles, siendo el acetato que hemos detectado en mayor número de mieles y en más orígenes botánicos, ML2, BR1, A1, M1, BQ1, CU1 y CS1. El acetato de 2-feniletilo, solo está presente en una miel, la ML1 y el acetato de anisilo y acetato de cinamilo solo aparecen en 3 mieles cada uno, el primero en la ML2, la M1 y la CS1 y el segundo en la ML2, la BR1 y la CU1.

Otros compuestos derivados del benceno: El 1-metoxi-4-propilbenceno (propilanisol), se ha encontrado en todos los orígenes botánicos, pero el dato que más destaca es su elevada concentración media en las mieles de brezo (2,74 mg/g), estos altos niveles ya han sido observados en otros estudios (Castro-Vázquez et al., 2009). El 3,4,5-trimetoxibencil metil éter aparece en todas las mieles de viborera, trébol y bosque y no ha sido detectado en ninguna miel de brezo.

4.3. COMPUESTOS DERIVADOS DEL CALENTAMIENTO Y ENVEJECIMIENTO (24 compuestos)

Estos compuestos se forman a partir de procesos no enzimáticos entre aminoácidos y azúcares o en procesos de calentamiento y envejecimiento de la miel. El más utilizado es el hidroximetilfurfural (HMF) que está incluido en la Legislación (DOCE, 2002; BOE, 2003) como marcador de envejecimiento y deterioro ya que su velocidad de formación aumenta con las altas temperaturas. En nuestro estudio este grupo representa un porcentaje del 10,4% del total de los compuestos analizados.

Derivados del furfural, el furfural aparece en las mieles de todos los orígenes botánicos, pero donde presenta mayor concentración media es en las mieles de brezo (1,88 mg/g), apareciendo en la totalidad de muestras de brezo y de aliaga.

Derivados del furano, el 2-furanmetanol (alcohol furfúrico) se ha identificado en todas las muestras excepto en la miel V2 y también se ha obtenido la máxima concentración media en las mieles de brezo (1,57 mg/g), seguida de cerca por la miel de castaño (1,36 mg/g), lo cual está en concordancia con otros trabajos (Bouseta et al., 1992; Guyot et al., 1998; Alissandrakis et al., 2011) donde se indica que la miel de castaño contiene mayores cantidades de este compuesto. El 3-furanmetanol, sin embargo, solo ha aparecido en una muestra de miel de bosque (BQ1) y a muy baja concentración (0,03 mg/g). El 2-3-dihidrobenzofurano se ha identificado en la totalidad de las mieles, la máxima concentración media (8,85 mg/g) se ha detectado en las mieles de trébol y la máxima concentración individual ha sido para la miel BQ1 (18,27 mg/g).

Derivados de la furanona, el 5-metil-2(3H)-furanona (angélica lactona) se ha detectado solo en 2 mieles (ML2 y BR4).

Derivados de la piranona, estos compuestos son los que se han detectado en mayor número de mieles, se han encontrado dos isómeros de la 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6- metil-4H-piran-4-ona en las 30 muestras de nuestro estudio. Cabe destacar el valor de la concentración del isómero 1 en la miel de castaño (11,89 mg/g) muy superior al del resto de orígenes botánicos.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Alissandrakis et al. (2011) donde este compuesto se identificó en casi todas las mieles del su estudio, alcanzando en las de castaño la mayor concentración (15,93 mg/g). El 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4H-piran-4-ona (ácido kójico) solo aparece en 4 mieles de dos orígenes botánicos (ML2, BR3, BR4 y BR5).

4.4. NORISOPRENOIDES (17 compuestos)

Los norisoprenoides son derivados de carotenoides, poseen un esqueleto 3,5,5-trimetilciclohex-2-eno, que puede sufrir reacciones de transformación por oxidación, deshidratación o ciclación. Son compuestos muy importantes en la determinación del perfil aromático ya que son detectables a concentraciones mínimas porque poseen propiedades sensoriales con bajo valor umbral de percepción y aportan matices propios como puede ser el floral. En nuestro estudio estos compuestos representan un 7,4 % del total de volátiles y semivolátiles.

En el estudio llevado a cabo por Machado et al. (2020) en mieles de brezo se identificaron los norisoprenoides α -isoforona, 4-hidroxi-4-(3-oxo-1-butenil)-3,5,6-trimetilciclohex-2-en-1-ona y 3-oxo- α -ionol en la mayor parte de las muestras. En nuestro estudio la β -isoforona también aparece en las mieles de brezo a mayor concentración que en el resto de mieles, aunque la máxima concentración se ha obtenido en la miel V4 (11,73 mg/g). El 3,3,5-trimetil-4-(2-acetiletil)-4,5 epoxi-ciclohexanol ha sido detectado en 7 mieles de diferentes orígenes florales, ML4, ML7, BR3, BR4, A2, BQ1 y CS1. El isómero 1 de la megastigmatrienona únicamente se ha detectado en la miel de cuernecillo. Esta es la única miel donde se han detectado los tres isómeros de la megastigmatrienona, apareciendo los isómeros 2 y 3 en algunas mieles de otros orígenes florales. El 3-oxo- α -ionol, en nuestro estudio, solo aparece en una miel de brezo, la BR1 y su máxima concentración se ha obtenido en la miel CU1 (4,59 mg/g), por lo que podría considerarse un posible marcador floral de miel de cuernecillo. La 2-hidroxi- β -ionona, solo aparece en 5 mieles, ML2, A2, CS1, BR2 y BR5, siendo en estas dos mieles de brezo donde se ha detectado a concentraciones más elevadas (19,07 mg/g y 8,60 mg/g respectivamente). Los dos isómeros del 6,7-dehidro-7,8-dihidro-3-oxo- α -ionol, se han identificado en pocas muestras (ML1, CU1 y CS1). El 4-hidroxi-4-(3-oxo-1-butenil)-3,5,6-trimetilciclohex-2-en-1-ona, aparece en las 30 mieles y destacamos su máxima concentración media es en las mieles de aliaga (6,91 mg/g) alcanzándose en una de ellas (A3) la máxima concentración 17,55 mg/g.

Por último, hay que indicar que otros norisoprenoides identificados en nuestras mieles han sido el (3S*,5R*,6R*,7E,9)-3,6-epoxy-7-megastigmen-5,9-diol que se ha identificado en todos los orígenes florales salvo en mieles de viborera y el (E)-4-r-1',t-2',c-4'-trihidroxi-3',6',6'-trimetilciclohexilbut-3-en-2-ona, que también se ha encontrado en todos los orígenes florales, pero destaca su aparición a elevadas concentraciones en todas las mieles de trébol, con una concentración media de 17,65 mg/g y un valor máximo de 36,77 mg/g en la T2 .

4.5. COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS (12 compuestos)

Se caracterizan por ser sustancias orgánicas que contienen un anillo formado por más de un tipo de átomos, además del carbono, los más comunes son nitrógeno, oxígeno y azufre. En nuestro estudio representan un 5,2% del total, dentro de este grupo se incluyen compuestos que pueden utilizarse como posibles marcadores de orígenes florales.

El 2 metilindol, está ausente en mieles de milflores, viborera, trébol y bosque y la concentración media a la que se ha identificado en las mieles de brezo es de 1,1 mg/g. El mentofurano, aparece en muestras de milflores, viborera y bosque. El 3-formil-indol y la 7-hidroxi-6-metoxi 2H-1 benzopiran-2-ona (escopoletina) aparecen ambos en una única miel de mielada, la M1.

4.6. TERPENOIDES (12 compuestos)

Este grupo representa tan solo un 5,2 % del total, se encuentran más frecuentemente en los aceites esenciales de las plantas que en el polen. Por esta razón estos compuestos no suelen usarse como marcadores botánicos, aunque su detección en las mieles a concentraciones inusuales, puede ser útil para determinar su origen botánico (Rintoul, 2002). Los terpenoides o polímeros del isopreno son moléculas muy diversas, ya que están formadas por un hidrocarburo insaturado de 5 carbonos (isopreno) que al polimerizarse da lugar a multitud de compuestos.

El limoneno, aparece en 2 mieles de viborera (V3 y V5) y en las dos de bosque, los derivados del linalol como el óxido de cis-linalol y el óxido de trans-linalol, se detectan a una concentración elevada (1,54 y 5,07 mg/g, respectivamente) en la miel de brezo BR4, en otros estudios el óxido de cis-linalol es un compuesto volátil específico usado como marcador en mieles monoflorales de trigo sarraceno, miel de naranjo y de acacia (Machado et al., 2020). En nuestro estudio este compuesto ha sido detectado en la ML4, V3, BR4, A1, A2, BQ1, ZR1 y CS1.

En nuestro estudio, al igual que en el de Falcão et al. (2017), el 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol (hotrienol) se ha identificado en 26 muestras y aparece a una importante concentración en las mieles de brezo con una concentración media de 2,30 mg/g, por lo que podría ser considerado marcador para este tipo de mieles. El único origen botánico donde no hemos encontrado este compuesto ha sido en la miel de cuernecillo. El 3,7-dimetil-1,5-octadien-3,7-diol (terpendiol), se ha identificado casi en las mismas 26 mieles en que hemos detectado el hotrienol, salvo en la BR2. En la miel de cuernecillo sigue sin detectarse este terpenoide, apareciendo en el resto de orígenes florales. Su concentración media en las muestras de brezo es bastante parecida a la del hotrienol (2,05 mg/g). El timol se ha detectado en 6 muestras, ML1, ML5, ML6, ML7, T3 y V1, en esta última se ha cuantificado la mayor concentración (1,70 mg/g). El 2,6-dimetil-2,7-octadien-1,6 diol tan solo se ha encontrado en la miel BR3.

El resto de terpenoides de nuestro estudio aparecen en menor número de mieles y a concentraciones más reducidas. De los dos isómeros del 3,7-dimetiloct-1-en-3,6,7-triol, ninguno aparece en mieles de brezo y el isómero 1, se ha cuantificado a una elevada concentración (7,09 mg/g) en la miel ML4 comparado con el resto de mieles. El gurjuneno, tan solo está presente en 4 mieles, ML2, BR2, A3 y en la de castaño, donde se ha obtenido la máxima concentración (2,28 mg/g). El totarol y neofitadieno aparecen también en una única miel cada uno de ellos, en la M1 y ML2, respectivamente.

4.7. FLAVONOIDES Y COMPUESTOS RELACIONADOS (5 compuestos)

Otro grupo de compuestos identificado durante el análisis de volátiles y semivolátiles ha sido el de los flavonoides. Este tipo de compuestos no suele determinarse junto con las sustancias volátiles, sino que se identifican mediante otros métodos específicos de análisis, basados en las técnicas de HPLC.

En nuestro estudio este grupo representa el 2,2 % del total y aparecen al final del cromatograma a partir del minuto 68. Estos compuestos no se han detectado en otros trabajos llevados a cabo con métodos de extracción similares, como los realizados por el grupo de investigación australiano de D'Arcy ya que se ha cortado el cromatograma a tiempos inferiores.

La pinostrobin chalcona se ha identificado en 28 muestras estando ausente solo en 2 mieles de viborera (V1 y V2). Su máxima concentración media se ha detectado en las mieles de milflores (1,92 mg/g) y en una de las mieles de este origen floral (ML1) se ha cuantificado la concentración más elevada (4,93 mg/g). En las mieles de brezo y trébol se han obtenido valores de concentración media de este flavonoide de 1,76 mg/g y 1,77 mg/g respectivamente.

La pinocembrina ha aparecido en 25 muestras, siguiendo un patrón parecido a la pinostrobin chalcona, en ambos casos destaca su ausencia, sobre todo, en las mieles de viborera y su máxima concentración media en las mieles de milflores (4,15 mg/g y 1,92 mg/g, respectivamente). En la miel ML1 se ha obtenido la máxima concentración tanto de pinocembrina (9,92 mg/g) como de pinostrobin chalcona (4,93 mg/g). En las mieles de brezo se ha obtenido el siguiente valor más elevado de concentración media de pinocembrina (4,04 mg/g).

El resto de flavonoides que han sido identificados en nuestros cromatogramas, tectocrisina, crisina y apigenina han aparecido en menor número de muestras y a menores concentraciones. La tectocrisina, solo aparece en 5 muestras, aunque en la ML1, alcanza una elevada concentración (22,94 mg/g). La crisina, solo presente en 8 muestras, se ha encontrado en las dos mieles de mielada (M1 y M2) y en la de cuernecillo ha alcanzado su máxima concentración (2,76 mg/g). Finalmente, la apigenina ha sido detectada en 10 muestras incluyendo todos los orígenes botánicos, ML4, ML6, ML7, V4, BR3, T1, A1, A2, M1 y BQ1.

4.8. COMPUESTOS POLICÍCLICOS (4 compuestos)

Representan un 1,7% de todos los compuestos analizados y se caracterizan por poseer en su estructura dos o más anillos de benceno unidos entre sí y en algunos casos un anillo pentagonal.

El 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno y el 2,4 dimetilindanilacetato, aunque se han detectado en 8 y 10 mieles respectivamente, en las muestras de brezo es donde se han determinado con más frecuencia y a la mayor concentración media (1,51 mg/g y 2,11 mg/g). El 1,2,3,4-tetrahydro-4,5,7-trimetil-1-naftol se encuentra en 4 mieles, 3 de ellas son de brezo (BR2, BR3 y BR5) con una concentración media de 0,84 mg/g y una de castaño (0,88 mg/g). La 2,3-dihidro-3,3,4,7-tetrametil-1H-inden-1-ona aparece en 4 muestras de diferentes orígenes florales: ML1, BR1, M1 y CU1.

4.9. COMPUESTOS DESCONOCIDOS (12 compuestos)

Estos compuestos, que no hemos conseguido identificar más que por sus masas, constituyen un 5,2 % del total de volátiles. Aparecen desde el minuto 15 hasta el 48 y también pueden indicarnos posibles orígenes florales.

El primero que eluye en nuestros cromatogramas, a un tiempo de retención de 15,49 minutos (desconocido de masas 55, 84, 112, 39) lo hemos identificado en mieles de brezo con una concentración media de 1,31 mg/g y también en las mieles de cuernecillo, zarzamora y castaño. El que aparece a los 33,91 minutos (desconocido de masas 133, 162, 118, 89, 77, 63) podría ser considerado un marcador floral de mieles de castaño, alcanzando su máxima concentración en la miel CS1 (6,82 mg/g). El desconocido de masas 107, 136, 77, 164, que eluye justo después, a los 34,04 minutos, también es un posible marcador de origen floral de brezo (concentración media de 2 mg/g).

El siguiente compuesto que nos pude indicar origen floral de brezo y aliaga es el que aparece a un tiempo de retención de 37,49 minutos (desconocido de masas 105, 147, 120, 119, 91, 204, 133) ya que se ha cuantificado a una concentración media de 3,96 mg/g para las mieles de brezo y de 2,08 mg/g para las de aliaga.

El desconocido de masas 43, 192, 38, 67, 95, 179, 109, 123, 135, 152, 207, que se ha identificado a los 41,83 minutos no se ha cuantificado en ninguna miel de viborera ni de brezo. Finalmente es destacable la presencia de un compuesto desconocido de masas 266, 251, 252, 133, 267, 253, que aparece al minuto 34,63 y se encuentra en 28 muestras del estudio, alcanzando su máxima concentración media en las mieles de trébol (3,30 mg/g).

4.10. POSIBLES MARCADORES

Los compuestos más significativos que pueden ser utilizados como posibles marcadores de orígenes botánicos y de gran interés para discriminaciones en estudios posteriores son:

COMPUESTOS ALIFÁTICOS

El 1 etoxibutano y 3-hidroxi-2-butanona solo aparecen en las dos mieles de bosque.

El 2,3-butanodiol (isómero 1), alcanza su máxima concentración media en las mieles de mielada.

La 2-hidroxiciclopent-2-en-1-ona, alcanza su máxima concentración media en las mieles de brezo.

DERIVADOS DEL BENCENO

El fenilmetanol, alcanza su máxima concentración media en las mieles de brezo.

El 4-vinil-2-metoxifenol, destaca su elevada concentración media en las mieles de brezo respecto al resto de los orígenes botánicos.

COMPUESTOS DERIVADOS DEL CALENTAMIENTO Y ENVEJECIMIENTO

El 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona (isómero 2) destaca por el valor de su concentración en la miel de castaño.

NORISOPRENOIDES

El 3-oxo- α -ionol, es en la miel de cuernecillo donde se encuentra a mayor concentración.

El isómero 1 de la megastigmatrienona solo se ha detectado en la miel de cuernecillo. Esta es la única miel donde se han detectado los tres isómeros de la megastigmatrienona, apareciendo los isómeros 2 y 3 en algunas mieles de otros orígenes florales.

TERPENOIDES

El 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol (hotrienol), podría ser utilizado como marcador de mieles de brezo ya que es en las mieles de este origen botánico donde presenta mayores concentraciones.

COMPUESTOS DESCONOCIDOS

El desconocido de masas 133,162,118,89,77,63, podría ser considerado un marcador floral de mieles de castaño.

El desconocido de masas 107,136,77,164, posible marcador floral de brezo.

El desconocido de masas 105,147,120,119,91,204,133, puede indicar origen floral de brezo y aliaga.

4.11. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Con cada uno de los aromas detectados se llevó a cabo un análisis estadístico de cajas y bigotes para determinar cuáles eran los componentes volátiles y semivolátiles que mostraban mayores diferencias entre las distintas muestras. De los 231 compuestos, se determinó que fueron 22 compuestos los que mejor separan las muestras analizadas (Tabla 8). Estos compuestos incluyen algunos de los que se han propuesto anteriormente como posibles marcadores de algunos tipos de mieles, pero no todos y otros que, aunque no los habíamos propuesto como característicos de algún tipo de miel sí contribuían a una mejor separación de las mieles de distintos orígenes botánicos. Con los compuestos seleccionados se realizó un análisis de componentes principales (PCA). En la Figura 33 se puede ver que la primera componente explicó un 24,30% de la varianza, mientras que la segunda componente explicó un 20,94%. PC1 principalmente fue definida por los compuestos 1-etoxibutano, 3-hidroxi-2-butanona, fenilacetaldéhidó, 3,4,5-trimetilfenol (hemimelitenol), acetato de anisilo y 3,4,5-trimetoxibencil metil éter, mientras que PC2 está definida más por los componentes 2,3-butanodiol (isómero 1), pinostrobin chalcona y pinocebrina. Se puede ver que las mieles de brezo se sitúan a la derecha del eje de la "y" donde los compuestos, fenilmetanol (alcohol bencílico), 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol (hotrienol), 4-vinil-2-metoxifenol y desconocido de masas 107, 136, 77, 164 se encuentran en mayor concentración que en las demás mieles, por lo que podrían ser propuestos como posibles marcadores. El fenilmetanol (alcohol bencílico) y el 3,4,5-trimetilfenol también se han encontrado en alta cantidad en mieles de brezo por otros autores (Castro-Vázquez et al., 2009; Plutowska et al., 2011), mientras que el 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol se ha encontrado principalmente en mieles de lavanda y naranja (Pérez et al., 2002; Alissandrakis et al., 2003). Los compuestos 1-etoxibutano y 3-hidroxi-2-butanona no se detectan en mieles de brezo. En ese mismo cuadrante se encuentra la miel de castaño, pero separada de las de brezo, con mayor contenido de 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6- metil-4-H-piran-4-ona (isómero 2) que las otras mieles. El ácido benzoico ha sido propuesto como marcador de miel de castaño en el estudio llevado a cabo por Castro-Vázquez et al. (2010). En nuestro estudio el ácido benzoico también está presente en cantidad elevada en la miel de castaño, pero presenta concentraciones similares en dos mieles de brezo y una milflores, lo cual disminuye su utilidad como posible marcador de miel de castaño. Por otro lado, la miel de cuernecillo también está separada claramente de las demás, marcada por su contenido en los compuestos megastigmatrienona (isómero 1), ácido 4-hidroxifenilacético y 3-oxo- α -ionol, pudiéndose proponer los tres compuestos como marcadores de este origen floral. Otro grupo puede ser el formado por las dos mieles de bosque caracterizadas por ser las únicas con los compuestos 1-etoxibutano y 3-hidroxi-2-butanona. Estos compuestos no han sido propuestos como marcadores de este origen floral por otros autores, sin embargo, otros compuestos como el ácido butanoico, el butirato de metilo, el α -pineno, α -felandreno y el α -terpineol han sido encontrados en mayor cantidad en este tipo de mieles (De la Fuente et al., 2007). En un último grupo se sitúan las mieles de

mielada, viborera, aliaga, trébol y milflores, no pudiendo ser separadas por los compuestos aromáticos.

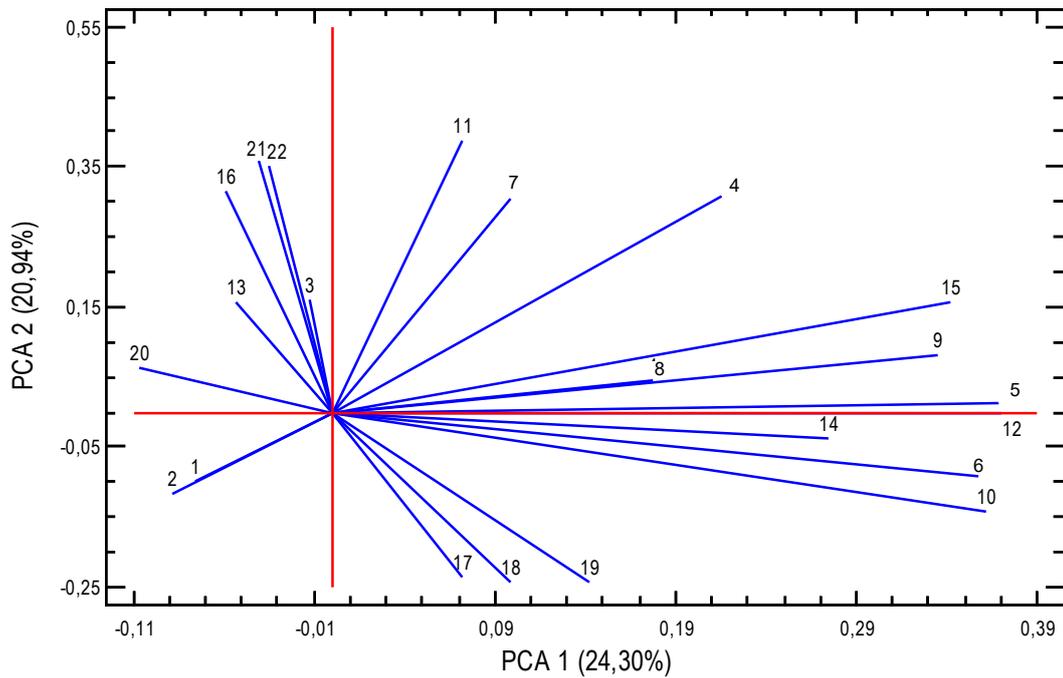
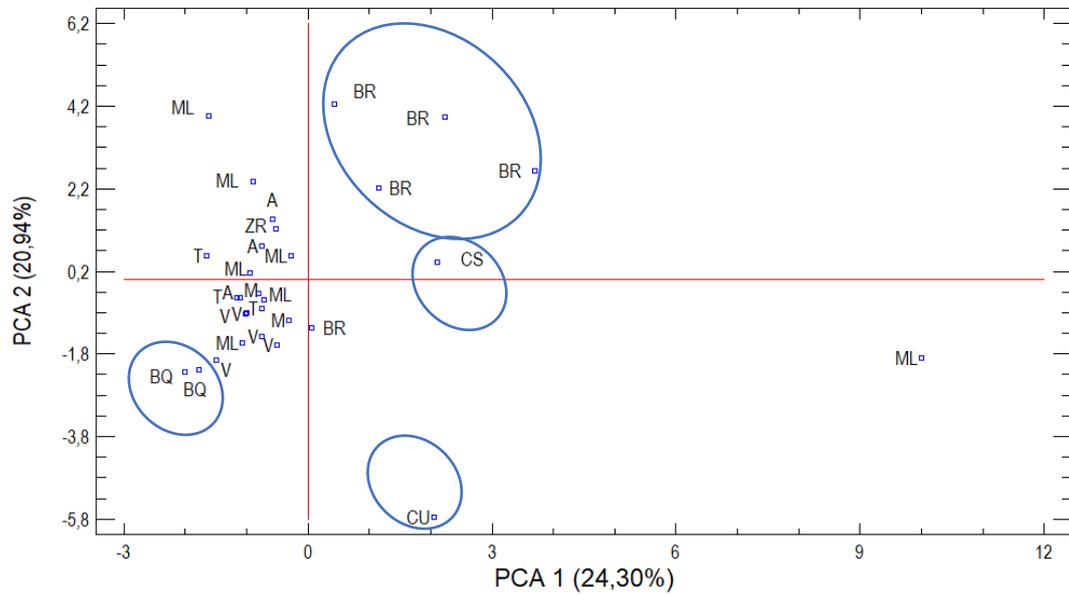


Figura 31. Análisis de componentes principales de las 30 muestras de miel en función de los 22 compuestos volátiles seleccionados

Tabla 8. Compuestos volátiles y semivolátiles seleccionados para el análisis de componentes principales

TR	Compuesto	Numeración para PCA
7,61	1-etoxibutano	1
7,79	3-hidroxi-2-butanona	2
9,01	2,3-butanodiol (isómero 1)	3
17,02	fenilmetanol (alcohol bencílico)	4
17,43	fenilacetaldehído	5
18,04	1-feniletanol	6
19,33	3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol (hotrienol)	7
21,63	2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6- metil-4-H-piran-4-ona (isómero 2)	8
22,61	ácido benzoico	9
22,76	2,2,6-trimetil 1,4-ciclohexadiona	10
28,85	4-vinil-2-metoxifenol	11
29,09	3,4,5-trimetilfenol (hemimelitenol)	12
32,14	3,7-dimetil oct-1-en-3,6,7-triol /isómero 2	13
33,35	acetato de anisilo	14
34,04	desconocido de masas 107,136,77,164	15
34,14	ácido 3-fenil-2-propenoico (ácido cinámico)	16
39,34	megastigmatrienona (isómero 1)	17
41,69	ácido 4-hidroxifenilacético	18
42,62	3-oxo- α -ionol	19
47,21	3,4,5-trimetoxibencil metil éter	20
68,56	pinostrobin chalcona	21
72,86	pinocembrina	22

5. CONCLUSIONES

- En las 30 mieles estudiadas se encontraron 76 compuestos alifáticos, 69 derivados del benceno, 24 compuestos derivados del calentamiento y envejecimiento, 17 norisoprenoides, 12 compuestos heterocíclicos, 12 terpenoides, 5 flavonoides, 4 compuestos policíclicos y 12 compuestos desconocidos.
- Los compuestos cuantificados en todas las mieles son: 2,5-dihidrofurandiona, fenilacetaldehído, 2-feniletanol (alcohol fenético), 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona (isómero 2), 2-3-dihidro-benzofurano, 5-hidroximetil-2-furancarboxaldehído (HMF), 4-vinil-2-metoxifenol, 4-hidroxi-4-(3-oxo-1-butenil) -3,5,6-trimetilciclohex-2-en-1-ona (dehidrovomifoliol) y el alcano con 29 átomos de carbono.
- Los compuestos volátiles y semivolátiles no permitieron separar las mieles de mielada, viborera, aliaga, trébol y milflores, posiblemente por la insuficiente cantidad de muestras de cada tipo. Sin embargo, los siguientes compuestos mostraron ser posibles marcadores del origen botánico de las mieles analizadas:
 - En mieles de mielada: 2,3-butanodiol (isómero 1).

- En mieles de bosque: 1- etoxibutano y 3-hidroxi-2-butanona.
- En mieles de brezo: 4-vinil-2-metoxifenol, fenilmetanol, 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol (hotrienol), desconocido de masas 105,147,120,119,91,204,133 y desconocido de masas 107,136,77.
- En mieles de cuernecillo: megastigmatrienona (isómero 1), ácido 4-hidroxifenilacético y 3-oxo- α -ionol.
- En mieles de castaño: 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6- metil-4-H-piran-4-ona (isómero 2) y el desconocido de masas 133,162,118,89,77,63.

IV.II. COMPUESTOS FENÓLICOS Y PROPIEDADES FUNCIONALES DE LA MIEL

IV.II.1. COMPUESTOS FENÓLICOS DE LAS MIELES

1. PROCESOS DE EXTRACCIÓN Y TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE FENOLES

De los compuestos bioactivos de la miel, el grupo que genera mayor interés es el de los compuestos fenólicos, debido a sus propiedades biológicas. Se trata de componentes minoritarios que se encuentran en concentraciones muy pequeñas, por lo que precisan técnicas analíticas selectivas, sensibles, y con gran capacidad de resolución para poder detectarlos y cuantificarlos. En los métodos analíticos para detectar y cuantificar estos compuestos bioactivos se suceden los pasos de extracción, separación e identificación de los mismos. La etapa más decisiva para la recuperación y el aislamiento de los compuestos fenólicos antes de su análisis es la extracción (Gómez Romero 2010). Esta extracción se puede denominar extracción química y puede realizarse de varias formas, obteniendo los compuestos de interés y eliminando otros compuestos que pueden interferir en el análisis.

La extracción química para la determinación de compuestos fenólicos se realiza para eliminar compuestos de la miel que pueden interferir en el análisis, como son los azúcares.

Las técnicas de extracción que más se utilizan en mieles son la extracción líquido-líquido y la extracción en fase sólida, algunos investigadores prefieren omitir la extracción para ganar tiempo, mientras que otros realizan una extracción rápida mediante el uso de ultrasonidos o microondas (Pascual-Maté, 2018).

La extracción líquido-líquido en mieles se ha utilizado principalmente usando acetato de etilo como solvente, obteniendo adecuados porcentajes de recuperación, sin embargo, presenta una importante desventaja, requiere el uso de grandes volúmenes de disolvente. Métodos más respetuosos con el medio ambiente son la extracción acelerada con disolventes y extracciones líquido-líquido dispersivo e inverso dispersivo. La extracción acelerada con disolventes es un procedimiento de extracción líquido-líquido automatizado que combina alta temperatura y presión, reduciendo así tiempo y consumo de disolvente. El proceso es caro y la alta temperatura empleada podría provocar la degradación de una cantidad importante de

compuestos fenólicos (Pascual Maté et al., 2018). Habib et al. (2014), demostró que esa degradación se reduce bastante al disminuir la temperatura de extracción a 25 °C. La extracción líquido-líquido dispersivo e inverso dispersivo, son técnicas más sencillas, rápidas, baratas y respetuosas con el medio ambiente que la extracción líquido-líquido. En ambos una solución mixta del solvente de extracción (con un punto de fusión cercano a la temperatura ambiente) y el solvente dispersivo se inyectan rápidamente en la muestra de miel que queremos analizar. Se produce una solución turbia con una amplia área de contacto entre el solvente de extracción y la muestra alcanzando el equilibrio rápidamente. Después de la centrifugación, el producto de extracción se sedimenta en la parte inferior del tubo de ensayo cónico en el método líquido-líquido dispersivo o en la parte superior si el método es el líquido-líquido inverso dispersivo. La diferencia de ambos métodos se debe a la densidad del solvente de extracción, en el primero es menor que el agua, mientras que en inverso dispersivo es mayor (Ranjbari et al., 2012).

La extracción en fase sólida es el método más común para el aislamiento de los polifenoles de la miel, utilizando Amberlita XAD-2 como resina polimérica, eliminando compuestos polares como azúcares y eluyendo los compuestos fenólicos previamente adsorbidos por la resina con metanol (Baltrušaitytė et al., 2007; Petretto et al., 2015). Esta técnica se ha ido modificando para mejorar la recuperación de los compuestos, mediante etapas previas y posteriores al paso de la muestra por la columna de Amberlita, como puede ser la agitación de la muestra previamente al paso por la columna o la limpieza y concentración del extracto, realizando una extracción líquido-líquido posterior del extracto metanólico con éter dietílico (Ouchemoukh et al., 2017). Neggad et al. (2021) han utilizado una resina biodegradable (BR) y la han comparado con la resina comercial común Amberlita XAD2. La extracción con BR se ha realizado en condiciones óptimas de pH, cantidad de BR, tiempo, temperatura y agitación. Se observó una diferencia significativa en el porcentaje de recuperación de polifenoles entre la extracción realizada por la resina BR y los logrados por la resina XAD2 obteniendo mayor contenido de polifenoles la utilización de resina BR en las tres muestras de miel analizadas. Xiao yu et al. (2021) establecieron y adoptaron con éxito un método de pretratamiento para el análisis cuantitativo de flavonoides y antraquinonas en muestras de miel desarrollando una nueva extracción en fase sólida utilizando quitina como adsorbente (SPE-quitina) detectando los compuestos mediante electroforesis capilar (CE).

Otra forma de realizar la extracción en fase sólida es utilizar cartuchos comerciales rellenos de diferentes fases estacionarias, lo cual hace el proceso más sencillo y rápido, necesitando menos cantidad de muestra y menos consumo de solventes que la utilización de Amberlita, pero sí que es necesario tener una bomba de vacío acoplada a un colector (Yung An et al., 2016). Los cartuchos más utilizados para la extracción de compuestos fenólicos son cartuchos hidrofóbicos de fase reversa de sílica ligados con octadecilo (C18), ideal para extraer compuestos no polares de muestras acuosas o el uso de solventes poliméricos, como

estireno-divinilbenceno y N-vinilpirrolidona-divinilbenceno o cartuchos de fase reversa de intercambio iónico (Pascual-Maté, 2018).

Una vez realizada la extracción química de los compuestos fenólicos, la técnica más utilizada para separar y cuantificar polifenoles en la miel es la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con detectores de espectrometría de masas o ultravioleta, aunque la electroforesis capilar también ha dado buenos resultados. Los grandes desafíos para el análisis futuro de los polifenoles que se encuentran en la miel son el uso de nuevos disolventes, optimizar los procedimientos actuales, y desarrollar técnicas analíticas rápidas (Pascual Maté 2018).

2. OBJETIVO

El objetivo de este estudio fue analizar el perfil de compuestos fenólicos de 15 muestras de miel de distinto origen botánico mediante HPLC-UV para caracterizar estas mieles.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MUESTRAS

Como se ha indicado en el plan de trabajo, en el análisis de compuestos fenólicos se han seleccionado 15 de las 30 muestras de miel, 5 de brezo, 3 de aliaga, 3 de viborera, 2 de mielada y 2 de bosque (Capítulo III, Tabla 4).

3.2. REACTIVOS Y MATERIAL

REACTIVOS

Metanol (VWR)

Agua miliQ (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.)

Metanol HPLC (VWR)

Ácido gálico, (Panreac)

Ácido cafeico (Panreac)

Catequina (Panreac)

Ácido p-cumarico (Panreac)

Ácido ferúlico (Panreac)

Naringenina (Sigma-Aldrich)

Pinocembrina (Cymit química, S.L., Barcelona, España)

Ácido clorogénico (Cymit química)

Ácido vanílico (Fluka Chemie GmbH)

Ácido cinámico (Sigma-Aldrich)

Ácido fórmico (VWR International Eurolab)

MATERIAL

Cartuchos Strata-X SPE (Phenomenex®, Torrance, CA, EEUU)

Filtros de jeringa de PVDF 0,45 µm (Whatman TM)

Cromatógrafo de Líquidos Varian Pro Star 310 con detector UV (Varian, Victoria, Australia)

Columna de fase reversa Microsorb-MV 100-5 C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm tamaño de partícula) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU)

3.3. EXTRACCIÓN

En la extracción de compuestos fenólicos para su detección y cuantificación mediante HPLC-UV se ha seguido el método descrito por Bertoneclj et al. (2011) utilizando cartuchos Strata-X SPE 200 mg/6 ml y mediante un equipo Manifold con bomba de vacío (Figura 34), con alguna modificación que ha ayudado a mejorar la purificación del extracto y la preconcentración.



Figura 32. Cartuchos Strata-X SPE y sistema Manifold para extracción

En primer lugar, los cartuchos fueron acondicionados con 3 ml de metanol, seguido de 3 ml de agua miliQ. Las muestras de miel (10 g) se disolvieron en 15 ml de agua acidificada a pH 2 con HCL concentrado y se cargaron en los cartuchos previamente acondicionados. Después se limpió la columna lavándola con 5 ml de agua miliQ acidificada a pH 2 y con 15 ml de agua miliQ, los cartuchos se secaron a vacío durante 3 minutos. Por último, la fracción fenólica retenida en el cartucho se eluyó con 5 ml de metanol HPLC. Antes de proceder a la inyección de las muestras en el equipo éstas fueron filtradas a través de filtros de jeringa de PVDF 0,45 µm, recogidas en viales de color ámbar y mantenidas en congelación (- 20 °C) hasta su uso.

3.4. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

3.4.1. *PREPARACIÓN DE LOS PATRONES Y DE LAS RECTAS DE CALIBRADO*

Los patrones comerciales utilizados en nuestro estudio han sido: ácido gálico, ácido cafeico, catequina, ácido p-cumarico, ácido ferúlico, naringenina, pinocebrina, ácido clorogénico, ácido vanílico y ácido cinámico. Primero se prepararon todos los patrones comerciales a una concentración de 2 mg/ml con metanol HPLC. Estos patrones se inyectaron (preparados a distintas concentraciones) de forma individual para conocer su tiempo de retención. Posteriormente, se elaboró una mezcla patrón madre con todos los patrones (0,1 mg/ml) y a partir de ella se prepararon diversas soluciones con concentraciones entre 0,0005 y 0,1 mg/ml. Al igual que en el caso de las muestras las soluciones patrón se filtraron empleando filtros de jeringa de PVDF de 0,45 μm (Whatman TM), que se recogieron en un vial ámbar y se mantuvieron a -20 °C. Las rectas de calibrado de cada uno de los patrones se obtuvieron inyectando en el HPLC las 7 soluciones de patrones preparadas, proceso que se repitió durante 3 días. Con la media de las tres rectas se calculó una recta patrón para cada compuesto. Además, todos los días se inyectó un punto de la recta patrón para conocer el tiempo de retención de cada compuesto, esto se realizó porque el tiempo de retención puede presentar pequeñas variaciones entre distintos días debido a que las fases móviles se preparaban a diario.

3.4.2. *CONDICIONES DEL MÉTODO*

Se utilizó para el análisis cualicuantitativo de compuestos fenólicos se se usaron como base los protocolos descritos por Seraglio et al. (2016) y Combarros-Fuertes et al. (2019) con algunas modificaciones. El análisis fue realizado en un cromatógrafo de líquidos Varian Pro Star 310 con detector UV (Figura 35) con una columna de fase reversa Microsorb-MV 100-5 C18 (150 x 4,6 mm, 5 μm), utilizando como fases móviles 0,1% de ácido fórmico en agua miliQ (A), 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo (B) y metanol (C) conforme al gradiente de solventes descrito en la Tabla 9 y con un flujo de 1 ml/min. Todas las fases móviles fueron desgasificadas en ultrasonidos durante 10 minutos antes de su uso. La cantidad de muestra o patrón inyectada fue de 20 μl . La detección se realizó a 280 nm. Cada día se realizó un lavado de una hora tanto al inicio como al final, siguiendo el mismo protocolo, pero sin inyectar la muestra. Entre muestra y muestra se realizó un run de limpieza con metanol.

Tabla 9. Condiciones de la fase móvil en gradiente de HPLC para el análisis de compuestos fenólicos en las mieles

Tiempo (min)	Fase móvil (%A)	Fase móvil(%B)	Fase móvil (%C)
0	100	0	0
10	92	8	0
20	90	10	0
27	80	20	0
37	50	50	0
40	50	50	0
45	0	100	0
50	0	100	0
55	0	0	100
65	0	0	100
66	100	0	0
70	100	0	0



Figura 33. Cromatógrafo de líquidos Varian Pro Star 310 con detector UV

3.5. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

La identificación de cada compuesto se determinó comparando sus tiempos de retención con las correspondientes soluciones patrón, inyectadas en idénticas condiciones. En la figura 36 se muestra un cromatograma de una mezcla patrón. Se realizó la cuantificación interpolando las áreas obtenidas de cada compuesto en las rectas patrón previamente descritas. Cada una de las mieles fue inyectada por triplicado.

3.5.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO HPLC

Para llevar a cabo la validación de un método han de conocerse los límites de cuantificación y detección, su reproducibilidad y repetibilidad, así como su exactitud/recuperación (Valls Puig, 2004).

LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD) Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)

Según Valls Puig (2004) el límite de detección se define como: “Cantidad mínima de analito que genera respuesta en el equipo, pero que no es cuantificable”, y el límite de cuantificación cómo: “Cantidad mínima de analito que produce una respuesta que puede ser cuantificable con precisión y exactitud bajo las condiciones del experimento establecidas”. Estos dos límites se valoran para el análisis de trazas, impurezas, productos de degradación o bien cuando el nivel de analito a determinar se encuentra cercano al límite de detección. En este estudio el límite de detección se calculó como 3 S/N y el límite de cuantificación se calculó como 10 S/N. Siendo S/N la señal ruido.

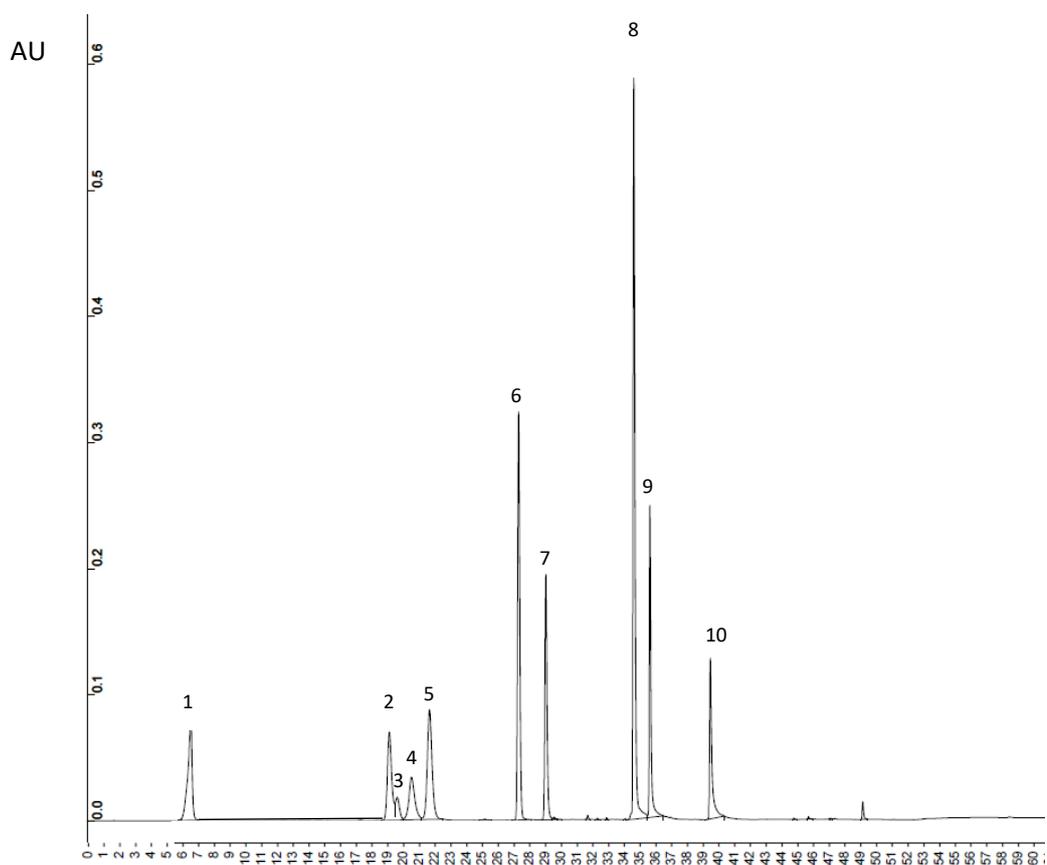


Figura 34. Cromatograma de la mezcla patrón de compuestos fenólicos 0,1 mg/ml con identificación de los picos: 1. Ácido gálico (6,5 min), 2. Ácido caféico (18,7 min), 3. Catequina (19,5 min), 4. Ácido clorogénico (20,5 min), 5. Ácido cafeico (21,6 min), 6. Acido p-cumárico (27,5 min), 7. Ácido ferúlico (29,1 min), 8. Ácido cinámico (34,5 min), 9. Naringenina (35,8 min), 10. Pinocembrina (39,5 min)

REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

La repetibilidad se define como la variación entre el promedio de las mediciones realizadas por el mismo analista, bajo las mismas condiciones y el mismo día (Valls Puig, 2004). La reproducibilidad se define como la variación entre los promedios de las mediciones realizadas

bajo diferentes condiciones (Valls Puig, 2004). Para conocer la precisión se determinó tanto la repetibilidad como la reproducibilidad se inyectó repetidamente una muestra de miel (H10). La repetibilidad se obtuvo analizando la muestra por triplicado el mismo día y bajo las mismas condiciones que se emplearon en todo el estudio (n=3). Para conocer la reproducibilidad, la muestra fue analizada también por triplicado, tres días diferentes. Al analizarse en tres días diferentes la composición de la fase móvil A y B pueden variar ya que se preparaban desde el inicio cada día (n=9). La repetibilidad y la reproducibilidad se expresaron mediante la desviación estándar relativa (%RSD) calculada mediante la siguiente fórmula: $\%RSD = (SD/M) \times 100$, donde SD es la desviación estándar y M es la media.

EXACTITUD/ RECUPERACIÓN

Corresponde a la diferencia entre el valor promedio obtenido y el valor verdadero, se trata del error sistemático. Determina las desviaciones entre nuestro método analítico y el considerado "método analítico ideal" (Valls Puig, 2004). En HPLC, para medir la exactitud del método, normalmente se emplea el porcentaje de recuperación de la muestra. Para ello se añadió a la muestra unas cantidades conocidas de analito, y se procedió a su cuantificación. Se analizó una muestra de miel (H10) y posteriormente esa misma muestra se analizó tras añadir una cantidad conocida de los patrones comerciales. Para ello se mezclaron en un eppendorf 50 µl de la mezcla patrón 0,1 mg/ml y 150 µl de la muestra H10, inyectándose en el HPLC previa filtración (PVDF de 0,45 µm). Este parámetro se calculó inyectando por triplicado dos días distintos tanto la muestra H10 como la muestra enriquecida con el patrón. Calculando el % de recuperación mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ recuperación} = \left[\frac{\text{Concentración de la muestra enriquecida} - \text{Concentración de la muestra}}{\text{concentración añadida de patrón (0,025 mg/ml)}} \right] \times 100$$

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como media junto con su desviación estándar. Para analizar las posibles diferencias existentes entre los compuestos fenólicos en función del tipo de miel, se realizó un análisis de normalidad para todos los parámetros. Para aquellos que cumplían con la normalidad se realizó un test de múltiples rangos mediante el test LSD a un intervalo de confianza del 95%, mientras que aquellos parámetros que no cumplían con el test de la normalidad se analizaron mediante un test de Kruskal-Wallis junto con el gráfico de cajas y bigotes. Con todos los compuestos fenólicos de cada muestra se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para poder observar si existen variables que agrupan las muestras. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statgraphics Centurion XVIII (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, VA, EEUU).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. VALIDACIÓN DEL METODO ANALÍTICO

En la Tabla 10 se muestran los datos del tiempo de retención (TR), el rango de linealidad, el coeficiente de correlación lineal R^2 , el límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) en mg/ml para los 10 patrones. Las curvas de calibración se obtuvieron representando el área del pico del compuesto en cada nivel de concentración frente a la concentración correspondiente. La respuesta de linealidad observada fue buena ya que R^2 fue mayor que 0,992 en todas las rectas patrones.

Tabla 10. Tiempo de retención (minutos), R^2 , Límite de cuantificación y Límite de detección (mg/ml) de los 10 patrones de compuestos fenólicos

Patrón	TR	Rango lineal (mg/ml)	R^2	LOD (mg/ml)	LOQ (mg/ml)
GÁLICO	6,5	0,0005-0,1	0,998	0,00016	0,00031
VANÍLICO	18,7	0,0005-0,1	0,993	0,00023	0,00038
CATEQUINA	19,5	0,0005-0,1	0,992	0,00044	0,00097
CLOGÉNICO	20,5	0,0005-0,1	0,993	0,00087	0,00101
CAFEICO	21,6	0,0005-0,1	0,996	0,00023	0,00033
P-CUMÁRICO	27,5	0,0005-0,1	0,993	0,00056	0,0007
FERULICO	29,1	0,0005-0,1	0,998	0,00026	0,00035
CINÁMICO	34,5	0,0005-0,1	0,995	0,00049	0,00058
NARINGENINA	35,8	0,0005-0,1	0,997	0,00021	0,00029
PINOCEMBRINA	39,5	0,0005-0,1	0,996	0,00034	0,00052

LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD) Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)

Los valores de sensibilidad, según lo descrito por el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se consideran adecuados, ya que los resultados de LOD obtenidos están entre 0,00016 y 0,00087 mg/ml y los LOQ entre 0,00029 y 0,001 mg/ml (Tabla 10). Siendo estos límites inferiores a los obtenidos por Combarros et al. (2019) y superiores a los encontrados por Seraglio et al. (2016).

REPETIBILIDAD, REPRODUCIBILIDAD Y RECUPERACIÓN

Los valores de repetibilidad, reproductibilidad y recuperación se muestran en la Tabla 11. La exactitud y la precisión estuvieron dentro de los límites aceptados por Kasiotis et al. (2017), donde consideran válidos los resultados por debajo del 20 %, también se establece que la relación entre la concentración del analito y el porcentaje de recuperación debe encontrarse en un rango de 80-120% para considerar válido el método.

Tabla 11. Valores de repetibilidad, reproductibilidad y recuperación del análisis de compuestos fenólicos mediante HPLC

COMPUESTO	Repetibilidad (%) (RSD%)	Reproducibilidad (%) (RSD%)	Recuperación (%)
GÁLICO	8,91	18,33	93,24
VANÍLICO	15,96	20,37	84,10
CATEQUINA	11,53	18,08	76,42
CLOROGÉNICO	19,91	20,09	94,15
CAFEICO	1,72	18,37	92,51
P-CUMÁRICO	3,79	15,73	93,87
FERULICO	12,06	15,10	84,43
CINÁMICO	16,34	20,25	79,28
NARINGENINA	10,52	14,32	84,67
PINOCEMBRINA	5,65	13,10	83,50

En nuestro método analítico se obtuvieron buenos valores de repetibilidad, situándose por debajo del 15% en 7 de los 10 compuesto fenólicos, no siendo ninguno superior a 20%. La reproductibilidad supera ligeramente el 20% en el vanílico (20,37 %), clorogénico (20,09%) y cinámico (20,25%), considerándose adecuados tanto la repetibilidad como la reproductibilidad. Los valores medios de las tasas de recuperación de los diez compuestos fenólicos se situaron entre 76,42 % y 94,15 %. Los valores que no se incluyen en el rango de 80% a 120% se encuentran muy cercanos a los adecuados (76,42 % y 79,28 %). Los resultados de validación de nuestro estudio indican que el método de análisis seleccionado es suficientemente sensible y preciso.

4.2. DETECCIÓN y CUANTIFICACIÓN DEL PERFIL FENÓLICO

En la Tabla 12 se muestra el resultado total de las concentraciones en mg/100 g de miel, de los diez compuestos fenólicos en todos los extractos analizados mediante HPLC, diferenciándolos según los distintos orígenes botánicos.

Tabla 12. Contenido en compuestos fenólicos (mg /100 g de miel) de las 15 mieles analizadas mediante HPLC

			GALICO	VANÍLICO	CATEQUINA	CLROG.	CAFEICO	P-CUMÁRICO	FERÚLICO	CINÁMICO	NARING.	PINOCEMB.
MIELADA	M1	H1	0,03±0,01 ^{bc}	0,21±0,02 ^{ab}	0,20±0,02 ^b	0,12±0,02 ^{de}	0,11±0,02 ^{ab}	0,08±0,01 ^a	0,51±0,06 ^h	0,15±0,00 ^d	0,38±0,01 ^b	0,12±0,01 ^b
	M2	H2	0,21±0,02 ^g	0,22±0,01 ^{abc}	0,15±0,01 ^{ab}	0,08±0,02 ^{bcd}	0,06±0,01 ^a	0,52±0,14 ^{de}	0,11±0,01 ^{ab}	0,17±0,01 ^{de}	0,65±0,04 ^{cd}	0,30±0,02 ^{de}
BOSQUE	BQ1	H3	0,20±0,02 ^g	0,19±0,007 ^{ab}	0,56±0,002 ^d	0,65±0,011 ^h	0,42±0,019 ^{ef}	0,77±0,142 ^g	0,35±0,014 ^{fg}	0,37±0,033 ^h	0,79±0,038 ^d	0,39±0,036 ^g
	BQ2	H4	0,07±0,04 ^{cde}	0,29±0,03 ^c	ND ^a	0,07±0,01 ^{bc}	0,37±0,05 ^{de}	0,13±0,00 ^{ab}	0,16±0,01 ^{bcd}	0,08±0,01 ^b	0,81±0,23 ^d	0,48±0,07 ^h
VIBORERA	V1	H5	ND ^a	0,18±0,00 ^a	0,17±0,00 ^{ab}	ND ^a	0,31±0,04 ^c	0,07±0,00 ^a	0,04±0,00 ^a	0,01±0,00 ^a	0,10±0,00 ^a	0,05±0,00 ^a
	V2	H6	1,19±0,04 ⁱ	0,23±0,01 ^{abc}	0,13±0,00 ^{ab}	0,30±0,00 ^g	0,43±0,02 ^{ef}	0,13±0,00 ^{ab}	0,14±0,00 ^{bc}	0,14±0,01 ^{cd}	0,15±0,01 ^a	0,08±0,00 ^{ab}
	V3	H7	0,05±0,00 ^{cd}	0,19±0,01 ^a	0,17±0,00 ^{ab}	ND ^a	0,13±0,02 ^{bc}	0,10±0,01 ^{ab}	0,04±0,00 ^a	0,02±0,00 ^a	0,16±0,00 ^a	0,11±0,01 ^{ab}
BREZO	BR1	H8	0,16±0,02 ^f	1,22±0,06 ^f	1,26±0,04 ^e	0,66±0,10 ^h	0,06±0,01 ^a	0,43±0,09 ^d	0,22±0,01 ^{de}	0,15±0,04 ^d	1,15±0,07 ^e	0,44±0,03 ^{gh}
	BR2	H9	ND ^a	0,42±0,08 ^d	3,83±0,33 ^f	0,34±0,05 ^g	0,06±0,02 ^a	0,48±0,04 ^{de}	1,10±0,11 ⁱ	0,25±0,02 ^f	1,05±0,11 ^e	0,45±0,04 ^{gh}
	BR3	H10	0,22±0,02 ^g	0,97±0,13 ^e	0,39±0,22 ^{cd}	0,06±0,05 ^{bc}	0,18±0,07 ^c	0,77±0,20 ^g	0,55±0,05 ^h	0,20±0,04 ^e	2,08±0,29 ^f	0,59±0,03 ⁱ
	BR4	H11	0,26±0,03 ^h	0,40±0,02 ^d	0,19±0,01 ^b	0,10±0,00 ^{cd}	0,18±0,01 ^c	0,31±0,02 ^c	0,15±0,00 ^{bcd}	0,10±0,02 ^{bc}	1,16±0,14 ^e	0,25±0,01 ^d
	BR5	H12	ND ^a	0,27±0,01 ^{abc}	0,27±0,02 ^{bc}	0,04±0,01 ^{ab}	0,09±0,01 ^{ab}	0,22±0,01 ^{bc}	0,29±0,01 ^{ef}	0,15±0,01 ^d	0,57±0,01 ^{bc}	0,31±0,02 ^{de}
ALIAGA	A1	H13	0,09±0,00 ^e	0,39±0,03 ^d	0,39±0,02 ^{cd}	0,15±0,03 ^e	0,61±0,04 ^g	0,29±0,01 ^c	0,20±0,01 ^{cd}	0,14±0,01 ^d	0,48±0,02 ^{bc}	0,34±0,02 ^{ef}
	A2	H14	0,01±0,01 ^{ab}	0,25±0,01 ^{abc}	0,15±0,00 ^{ab}	0,22±0,04 ^f	1,00±0,06 ^h	0,70±0,05 ^{fg}	0,19±0,02 ^{cd}	0,21±0,04 ^e	0,43±0,07 ^b	0,19±0,05 ^c
	A3	H15	0,01±0,02 ^{de}	0,28±0,01 ^{bc}	0,23±0,02 ^{bc}	0,04±0,01 ^{ab}	0,45±0,03 ^f	0,60±0,02 ^{ef}	0,36±0,02 ^g	0,31±0,02 ^g	0,56±0,01 ^{bc}	0,39±0,06 ^{fg}

CLROG.: Clorogénico; NARING.: Naringenina; PINOCEMB.: Pinocebrina. a-i: letras distintas muestras diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras para un mismo compuesto

El ácido gálico presenta un rango de concentraciones entre 0 y 1,19 mg/100 g, dentro de nuestros extractos es el compuesto fenólico que se ha cuantificado en menor concentración y aparece como no detectado en 3 muestras. La máxima concentración de este compuesto se determinó en una de las tres mieles de viborera la H6 (V2), siendo este tipo de mieles en las que se obtuvo la mayor concentración media (0,42 mg/100 g). En las mieles de aliaga fue el compuesto de menor concentración media (0,06 mg/100 g). Resultados similares mostró Vazquez et al. (2021) en su estudio sobre 91 mieles de Galicia donde las mieles de brezo presentaron un rango de concentración de este compuesto inferior al nuestro (de 0,02 a 0,11 mg/100 g) mientras que el rango de concentración para las mieles de mielada fue superior (0,16 - 0,98 mg/100 g). Sin embargo, Yiuchung Cheung et al. (2019) obtuvieron que el ácido gálico fue uno de los compuestos más dominantes en miel de bosque de España, presentando un valor medio de $6,4 \pm 3,7$ mg/100 g.

El ácido vanílico presenta un rango de concentraciones entre 0,18 y 1,22 mg/100 g, es en las mieles de brezo donde se obtiene su mayor concentración media (0,66 mg/100 g), mientras que en las de viborera se detectó la menor concentración media (0,20 mg/100 g), siendo las concentraciones en las tres mieles de este origen las de menor valor. Con este compuesto nos sucede lo mismo que con el ácido gálico si comparamos los resultados con Vazquez et al. (2021), el rango de concentración en mieles de brezo es inferior al nuestro (de 0,01 mg/100 g) y en las mieles de mielada el valor de la concentración máxima de este compuesto es superior (0,62 mg/100 g). Yiuchung Cheung et al. (2019) cuantificaron el ácido vanílico en la miel de tomillo de España con una concentración de $0,51 \pm 0,04$ mg/100 g.

La catequina, presenta un rango de concentraciones entre 0 y 3,83 mg/100g, al igual que con el ácido vanílico, es en las mieles de brezo donde se cuantificó la mayor concentración media (1,19 mg/100 g) y en las de viborera la menor (0,16 mg/100 g). Es en la miel H9 (BR2), de brezo donde alcanza el máximo valor. Can et al. (2015), en su estudio sobre mieles turcas, también obtuvo la máxima concentración de catequina en las mieles de brezo, aunque con un valor menor al nuestro (2,31 mg/100 mg).

El ácido clorogénico, presenta un rango de concentraciones entre 0 y 0,66 mg/100 g, no siendo detectado en dos de las tres mieles de viborera y obteniendo su máximo en una miel de brezo H8 (BR1). El máximo valor de concentración media (0,36 mg/100 g) se obtuvo en las mieles de bosque, mientras que en las muestras de mielada, junto con las de viborera es donde se detectó la menor concentración media (0,1 mg/100 g). Otros estudios obtuvieron rangos de concentración para este compuesto mayores que los de nuestro estudio, así mieles polacas de brezo presentaron un rango entre 0,01 y 3,34 mg/100 g (Jasicka-Misiak et al., 2012) y mieles italianas de distintos orígenes botánicos presentaron un rango entre 0,25-1,54 mg/100 g (Preti et al., 2022).

El ácido cafeico, presentó un rango de concentraciones entre 0,06 y 1,00 mg/100 g, siendo en las muestras de aliaga donde se encontró tanto la mayor concentración media (0,69 mg/100 g) como la mayor concentración individual en la H14 (A2) y en las de mielada la menor concentración media (0,08 mg/100 g) y la menor individual en la H2 (M2). Un rango similar (0,12-1,77 mg/100 g) fue encontrado por Preti et al. (2022) en mieles italianas de distintos orígenes botánicos. Tomás-Barberán et al. (2001) obtuvieron valores similares (0,06 y 0,10 mg/100 g) en mieles de brezo europeas, mientras que Vazquez et al. (2021) obtuvieron valores menores en mieles de brezo gallegas (0,01-0,04 mg/100 g).

El ácido p-cumárico, presenta un rango de concentraciones entre 0,07 y 0,79 mg/100 g. La máxima concentración media se obtuvo en mieles de aliaga (0,53 mg/100 g) y la individual en la miel H10 (BR3). La mínima concentración media (0,11 mg/100 g) se detectó en las mieles de viborera, siguiendo la tendencia de la mayoría de compuestos fenólicos determinados en nuestro estudio. Jasicka-Misiak et al. (2012) obtuvieron valores superiores a los nuestros con concentraciones entre 0,02 y 4,55 mg/100 g, mientras que Kędzińska-Matysek et al. (2021) obtuvieron valores similares (0,1-0,7 mg/100 g) en mieles polacas de distintos orígenes botánicos. Finalmente, Seraglio et al. (2016) obtuvieron valores menores con un rango de concentración para 9 mieles de Brasil entre 0,036 y 0,042 mg/100 g.

El ácido ferúlico, presenta un rango de concentraciones entre 0,04 y 1,10 mg/100 g. La máxima concentración media se dio en mieles de brezo (0,46 mg/100 g) y la mínima en las de viborera (0,08 mg /100 g), la máxima concentración individual de este compuesto se ha cuantificado en la miel H9 (BR2) y la mínima en la miel H5 (V1). Diferentes estudios muestran concentraciones menores de este compuesto en la mayor parte de las mieles estudiadas, obteniendo un rango entre 0,02 y 0,26 mg/100 g (Ahmed et al., 2016; Seraglio et al., 2016; Kędzińska et al., 2021).

El ácido cinámico, presenta un rango de concentraciones entre 0,01 y 0,37 mg/100 g, el valor máximo de concentración media se ha obtenido en mieles de aliaga (0,22 mg/100 g) y el mínimo, de nuevo, en las de viborera (0,06 mg/100 g). Este compuesto presentó menores concentraciones en otros estudios, con valores entre 0,017 y 0,118 mg/100 g en mieles multiflorales (Ahmed et al., 2016; Kędzińska et al., 2021).

La naringenina es el compuesto mayoritario en la mayor parte de las mieles evaluadas. Presentó un rango de concentraciones entre 0,1 y 2,08 mg/100 g, con máximos valores de concentración media en muestras de brezo y mínimos en mieles de viborera. Preti et al. (2022) en sus 48 mieles italianas analizadas determinaron un rango de concentraciones inferior al nuestro (0,06-0,22 mg/100 g).

La pinocembrina, presentó un rango de concentración entre 0,05 y 0,59 mg/100 g, la máxima concentración media se dio en las mieles de bosque (0,44 mg/100 g), aunque la máxima

concentración individual se cuantificó en la miel de brezo H10 (BR3), su menor concentración media (0,08 mg/100 g) y la individual (H5 (V1)), como en la mayoría de los compuestos fenólicos analizados, se obtuvo en las mieles de viborera. Estos datos están en consonancia con el análisis de pinocembrina llevado a cabo en esta tesis doctoral mediante el análisis de compuestos volátiles y semivolátiles donde se detectó la pinocembrina en mayor concentración en mieles de brezo y no se detectó en ninguna de las mieles de viborera. Tomás-Barberán et al. (2001) describieron en mieles de brezo europeas un rango de concentraciones de pinocembrina mayores al nuestro (0,078-1,137 mg/100 g).

Como puede apreciarse en la Tabla 13 en ocho de los diez compuestos fenólicos analizados, la mínima concentración media según el origen botánico se obtuvo en las mieles de viborera. Solo el **ácido gálico** y **cafeico** presentaron menor concentración media en otros orígenes florales, como son el de aliaga y de mielada, respectivamente. En cuanto a los orígenes florales donde se obtiene la mayor concentración media de los diferentes compuestos fenólicos existió mayor diversidad. El ácido gálico fue mayoritario en las muestras de viborera. Los ácidos vanílico, ferúlico, la catequina y la naringenina fueron mayoritarios en las muestras de brezo, el ácido clorogénico y la pinocembrina en las mieles de bosque y el ácido cafeico, p-cumárico y cinámico en las mieles de aliaga.

Tabla 13. Valores máximos y mínimos de concentración media de compuestos fenólicos de las mieles según su origen botánico

FENOLES	MAX (mg/100 g)	ORIGEN BOTÁNICO	MIN (mg/100 g)	ORIGEN BOTÁNICO
GÁLICO	0,42	VIBORERA	0,06	ALIAGA
VANÍLICO	0,66	BREZO	0,20	VIBORERA
CATEQUINA	1,19	BREZO	0,16	VIBORERA
CLOROGÉNICO	0,36	BOSQUE	0,10	MIELADA VIBORERA
CAFEICO	0,69	ALIAGA	0,08	MIELADA
P-CUMÁRICO	0,53	ALIAGA	0,11	VIBORERA
FERÚLICO	0,46	BREZO	0,08	VIBORERA
CINÁMICO	0,22	ALIAGA	0,06	VIBORERA
NARINGENINA	1,20	BREZO	0,14	VIBORERA
PINOCEMBRINA	0,44	BOSQUE	0,08	VIBORERA

La concentración de compuestos fenólicos y los perfiles fenólicos variaron bastante entre las muestras. Poniendo de manifiesto lo dicho por otros autores, sobre que las mieles tienen perfiles fenólicos similares, pero cuantitativamente diferentes, obteniendo importantes diferencias cuantitativas en los perfiles fenólicos y concluyendo que un perfil fenólico es más o menos único para cada miel (Gheldof et al., 2002; Halagarda et al., 2020).

4.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Realizando un estudio de componentes principales con los 10 compuestos fenólicos analizados en las 15 mieles, podemos determinar que las dos primeras componentes explican un 58,28% de la varianza (Figura 37).

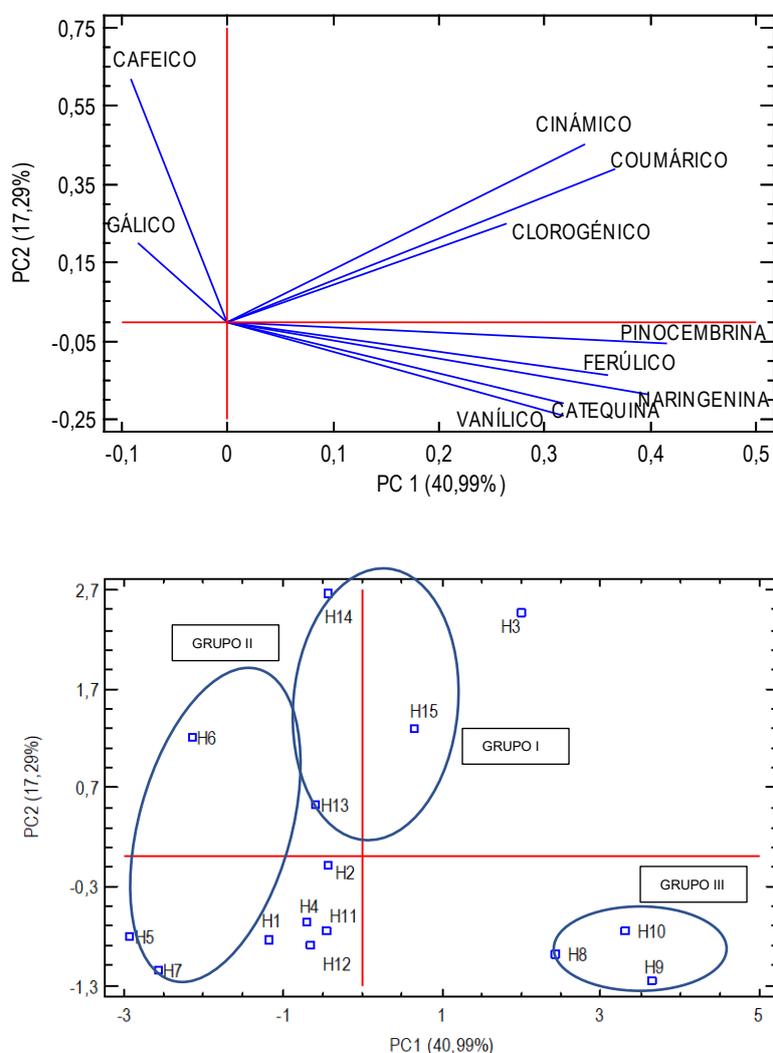


Figura 35. Análisis de componentes principales de las mieles según los compuestos fenólicos

La PC1 (40,99%) está definida principalmente por la mayoría de los compuestos fenólicos analizados, destacando la pinocembrina y el ferúlico, mientras que la PC2 (17,29%) está definido por el ácido cafeico. Se pueden diferenciar tres grupos, el grupo I donde están las tres mieles de aliaga, que tienen alto contenido en ácido cafeico, el grupo II donde se encuentran todas las mieles de viborera caracterizadas por bajo contenido en la mayor parte de los compuestos fenólicos analizados y el grupo III, donde encontramos a tres muestras de las 5 de brezo, caracterizadas por su elevado contenido en naringenina, catequina y pinocembrina. Las otras dos muestras de brezo se separan de estas debido a su menor contenido en clorogénico, pinocembrina y p-cumárico en comparación con las otras muestras

de brezo. Las muestras de mielada y bosque se encuentran juntas, a excepción de la muestra H3, caracterizadas por menor contenido en los ácidos cinámico, p-cumárico y clorogénico.

5. CONCLUSIONES

1. El perfil fenólico de las mieles varió de una miel a otra independientemente del origen botánico, pudiendo concluir que es único para cada miel. De manera general el ácido gálico es el compuesto fenólico que se detectó en menor cantidad y en un menor número de muestras, seguido por el ácido clorogénico, mientras que la naringenina fue el compuesto con una concentración más elevada en la mayor parte de las muestras.
2. Las muestras de viborera son las que menor concentración exhibieron de compuestos fenólicos, mientras que las muestras de brezo son las que de forma general mostraron mayor concentración. Se puede determinar que la naringenina es predominante en mieles de brezo y bosque, mientras que el cafeico es predominante en las mieles de aliaga. El ácido clorogénico, junto con el cafeico fueron los ácidos fenólicos minoritarios en las mieles de brezo.

IV.II.2. INFLUENCIA DE DISTINTOS PROCESOS DE EXTRACCIÓN EN LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LA MIEL

1. PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN LA MIEL

Como hemos descrito anteriormente la gran importancia de los compuestos fenólicos en la miel hace que se evalúen estos compuestos, así como las propiedades biológicas de los mismos después de realizar una extracción química. Sin embargo, varios trabajos están de acuerdo en la limitación que supone quedarnos solo con la extracción de estos compuestos fenólicos sin tener en cuenta la totalidad del alimento por una parte y la acción real que el proceso de digestión puede tener en el alimento por otra. Así los cambios físicos y químicos que tienen lugar durante la digestión pueden modificar la bioaccesibilidad de los compuestos (cantidad de un compuesto liberado de la matriz durante el proceso digestivo y disponible para su absorción a través de la pared intestinal) y la biodisponibilidad (cantidad de un compuesto liberado por el proceso de digestión que es absorbido por la pared intestinal y llega al torrente sanguíneo) de los mismos y por lo tanto verse modificadas sus actividades biológicas (Seraglio et al., 2021). En este sentido recientemente se está empezando a estudiar otro tipo de extracción en la miel: La extracción fisiológica.

Además de realizar una extracción química o una extracción fisiológica, cabe mencionar que en otros alimentos también existe la opción de valorar la actividad de estos compuestos mediante un sistema rápido que minimiza el uso de reactivos, el método QUENCHER (QUick, Easy, New, CHEap y Reproducible), donde se evalúa directamente el alimento una vez liofilizado.

1.1. EXTRACCIÓN QUÍMICA

En el apartado IV.I.1 Compuestos fenólicos de las mieles, se ha introducción las distintas formas de realizar una extracción química de la miel.

1.2. EXTRACCIÓN FISIOLÓGICA-DIGESTION

Durante la última década, ha aumentado el interés por comprender el destino digestivo de los compuestos bioactivos de la miel para esclarecer sus posibles efectos en la salud humana (Rasines, 2019). La digestión de los alimentos es un proceso complejo que consta de varios pasos, y reacciones bioquímicas en los diferentes compartimentos del tracto gastrointestinal, como boca, estómago, intestino delgado y grueso (Dupont et al., 2019; Egger, Ménard y

Portmann, 2019). El hígado y el páncreas también juegan un papel importante ya que secretan enzimas hidrolíticas y sales biliares (Lucas-Gonzalez et al., 2018).

Durante la digestión, los alimentos sufren unos cambios físicos y químicos que tendrán un impacto en la bioaccesibilidad, biodisponibilidad y sobre la bioactividad de un compuesto o grupo específico de compuestos (Alminger et al., 2014; Lucas-González et al., 2018). Los compuestos que se encuentran en la miel, como hidratos de carbono, vitaminas, metilglioxal, peróxido de hidrógeno, compuestos volátiles y fenólicos, péptidos, aminoácidos, minerales, oligosacáridos y ácidos orgánicos son los responsables de los aspectos nutricionales, fisicoquímicos y propiedades biológicas de este alimento (Pita-Calvo y Vázquez, 2017; Ávila et al., 2018; Machado de Melo et al., 2018; Seraglio et al., 2019; Karabagias et al., 2020), y estas propiedades pueden verse influenciadas por la gran variedad de factores que suceden durante el proceso digestivo. Por ello, la investigación de la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos de la miel es fundamental para profundizar en los posibles efectos de estos compuestos sobre la salud humana.

Para realizar estos estudios se pueden utilizar varios métodos que incluyen modelos *in vitro* estáticos y dinámicos, diversos cultivos celulares e *in vivo*, en animales y seres humanos. Idealmente, la digestión de los alimentos debería estudiarse *in vivo* en seres humanos, pero esto no siempre es posible desde el punto de vista ético y económico. Por este motivo, como alternativa a los experimentos *in vivo* se han propuesto diferentes modelos que imitan el tracto gastrointestinal en la digestión simple (Bohn et al., 2018).

LA DIGESTIÓN IN VITRO EN LA MIEL

La digestión *in vitro* trata de imitar el comportamiento de los alimentos en el aparato digestivo (Lucas González, 2016) y para ello se simulan las distintas etapas de la digestión en laboratorio añadiendo los enzimas pertinentes y ajustando el pH para realizar una digestión *in vitro*, que puede utilizar modelos estáticos o dinámicos.

Los modelos estáticos son los más simples y consisten en uno o una serie de recipientes en los que se simulan las diferentes etapas de la digestión, utilizando diferentes temperaturas, enzimas, pH y sales biliares, sirviéndose de diferentes herramientas (Muttakin et al., 2019; Li et al., 2020). Los modelos dinámicos son más prometedores para imitar con precisión el sistema digestivo, ya que son sistemas con uno o múltiples compartimentos controlados por ordenador. Estos modelos permiten la simulación de aspectos dinámicos de la digestión, tales como transporte de alimentos digeridos, movimientos peristálticos y, secreciones continuas de fluidos digestivos, concentraciones variables de enzimas y ajuste activo del pH (Dupont et al., 2019; Muttakin et al., 2019; Li et al., 2020). Los métodos de digestión *in vitro* estáticos son los más utilizados porque son los más fáciles de usar y los más económicos. Entre los factores más importantes implicados en los estudios *in vitro* citaremos la elección de las enzimas empleadas, las condiciones de incubación y los requerimientos de los equipos. Algunas enzimas precisan de la presencia de cofactores para ser activadas, por ejemplo, la lipasa pancreática necesita calcio y sales biliares (Boisen y Eggum, 1991). Es muy importante a la

hora de realizar estos protocolos identificar la finalidad del estudio; así el empleo de una enzima individual aporta información sobre la digestibilidad asociada a ese enzima para uno o varios nutrientes, un ejemplo es la acción de la amilasa sobre los almidones (Boisen y Eggum, 1991). En otras ocasiones se emplean mezclas de enzimas complejas ya pueden existir efectos combinados en la digestión de nutrientes (Hur et al., 2011).

Entre las ventajas de los modelos de digestión *in vitro* destacaremos que son los más reproducibles, ya que las condiciones digestivas (tipo y concentración de enzimas, sales, valores de pH y tiempo de digestión) se controlan en todo momento (Minekus et al., 2014; Brodkorb et al., 2019; Li et al., 2020). Los modelos de digestión *in vitro* son considerados como una herramienta fundamental para determinar el posible impacto de la digestión sobre las características estructurales, químicas y biológicas de alimentos (Shani-Levi et al., 2017; Lucas-González et al., 2018; Li et al., 2020). Además, se están realizando continuos avances para desarrollar sistemas de digestión *in vitro* fiables que pueden imitar el tracto gastrointestinal humano de la forma más real posible (Brodkorb et al., 2019; Li et al., 2020). Estos métodos, aunque son una gran herramienta de investigación también presentan limitaciones y desventajas, porque inevitablemente su precisión nunca será como la de los estudios de la digestión *in vivo* (Coles et al., 2005). Reproducir todas las situaciones que suceden durante la digestión con estos ensayos no es posible debido a la complejidad de las interacciones entre el organismo y el alimento (Minekus et al., 2014). No tiene en cuenta importantes factores que influyen en la digestión humana como la edad, el sexo, presencia de patologías y/o genética (Lucas González, 2017). Además, al diferir entre sí en varios parámetros (tipo y concentración de enzimas, las sales y tampones utilizados, los polímeros biológicos, los componentes tensioactivos, etc) la comparación de resultados entre estudios se dificulta considerablemente (Almaas et al., 2006).

Seraglio et al. (2021) ha realizado una revisión bibliográfica extensa sobre todos los trabajos realizados en miel donde se llevó a cabo la digestión *in vitro* de la misma y la evaluación de distintos compuestos como minerales, compuestos fenólicos, metilglioxal, azúcares, ácidos orgánicos, así como la evaluación de su actividad antioxidante. En la Tabla 14 se muestra un resumen de los estudios que se han realizado hasta el momento sobre la evaluación de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y antimicrobiana de las mieles después de su extracción fisiológica *in vitro*. La mayoría de los métodos *in vitro* de la miel comprenden una fase de simulación gástrica seguida de otra de simulación del intestino delgado y a veces incluyen la fermentación bacteriana en el intestino grueso. En ninguno de ellos se ha incluido la simulación de la fase oral ya que la miel no es un alimento sólido, cuyos principales componentes son monosacáridos (fructosa y glucosa) que son absorbidos directamente. Además, durante el proceso de elaboración de la miel este paso ya ha sido realizado parcialmente por las abejas. Sin embargo, el estudio de la simulación oral en la digestión de la miel podría ser interesante. Los protocolos seguidos en la evaluación de la digestión *in vitro* de la miel imitan las diferentes fases de la digestión humana con enzimas disponibles comercialmente (sobre todo de origen porcino como la pepsina y la pancreatina). Tras la

digestión *in vitro*, la bioaccesibilidad se determina después de la centrifugación (Mandalari et al., 2013), la centrifugación / filtración (Kaulmann et al., 2015) o alternativamente, después de la difusión a través de membranas semipermeables (diálisis) (Cianciosi et al., 2020), simulando que sólo las pequeñas moléculas solubles pueden ser absorbidas por el epitelio. La principal diferencia entre los estudios de digestión de la miel está relacionada con la dilución de la miel antes de la digestión. Cianciosi et al. (2020) utilizaron 10 g de miel disueltos en 100 ml de agua miliQ, Daglia et al. (2013) y Mannina et al. (2016) utilizaron 20 g en 10 ml de agua, O'Sullivan et al. (2013) utilizaron 0,5 g en 10 ml de agua, Degen et al. (2013) lo realizaron con 0,1 g de miel en 4 ml de solución gástrica sintética y Parkar et al. (2017) con 3,8 g de miel en 160 ml de medio gástrico (Tabla 14). Es probable que esas diferentes en las concentraciones puedan influir en los valores de las actividades analizadas, dificultando la comparación de resultados.

Hasta la fecha no se han realizado estudios en la miel evaluando el efecto de la digestión *in vitro* mediante modelos dinámicos.

Tabla 14. Revisión de diferentes procesos de digestión *in vitro* realizados en la miel (modificación de Adrian, 2020)

TIPOS DE MIEL	CANTIDAD MIEL	FASE GÁSTRICA	FASE DUODENAL	FASE COLÓNICA	REFERENCIA
5 mieles comerciales de manuka	20 g de miel en 10 ml agua miliQ	pH 2 con HCl. Enzimas: pepsina de mucosa gástrica porcina (40 mg/g). Incubación: baño de agua con agitación a 37 °C/ 2h	pH 7 con NaHCO ₃ . Medio: pancreatina de origen porcino (0,5 mg por g de miel) y sales biliares (3,1 mg por g de miel). Incubación: 1 hora a 37 °C		(Daglia et al., 2013)
3 mieles comerciales milflores y 1 miel de manuka	0,5 g miel en 10 ml de HBBS (Hanks balance salts solution)	pH 2 con HCl Enzimas: pepsina porcina (0,04 mg/l) Incubación: baño de agua con agitación (95 rpm) a 37 °C durante 1 h	pH 5,3 con NaHCO ₃ (sales biliares) pH 7,4 con NaOH. Medio: Pancreatina (80 mg/ml) glicodesoxicolato, (0,8 mM) taurodesoxicolato (0,4 mM) y taurocolato (0,7 mM). Incubación: 2 h en baño de agua con agitación a 37°C		(O'Sullivan et al., 2013)
1 miel comercial de manuka	0,1 g de miel en 4 ml de solución gástrica sintética (NaCl, KCl, KH ₂ PO ₄)	pH 2 con HCl. Enzimas: 25 mg de pepsina y 75 mg de mucina por g de miel. Incubación: a 37 °C con agitación durante 2h	pH 7,5 con NaHCO ₃ Medio: 10 mg de tripsina y 320 mg pancreatina por g de miel en solución gástrica sintética (KCl, CaCl, urea, MgCl, sales biliares, NaCO ₃). Incubación: 6 h a 37 °C con agitación.		(Degen et al., 2013)

Resultados: Influencia de la extracción en las propiedades biológicas

TIPOS DE MIEL	CANTIDAD MIEL	FASE GÁSTRICA	FASE DUODENAL	FASE COLÓNICA	REFERENCIA
1 miel comercial de manuka, y su extracto polar y no polar	20 g de miel en 10 ml agua miliQ	pH 2 con HCl Enzimas: 40 mg de pepsina por g de miel. Incubación: a 37 °C durante 2h	pH 7 con NaHCO ₃ Medio: 0,5 mg de pancreatina y 3,1 mg de sales biliares por g de miel; Incubación: 1 h a 37 °C		(Mannina et al., 2016)
1 miel de manuka	3,8 g de miel en 160 ml de medio gástrico	pH 2 con HCl Enzimas: pepsina (4,210 mg de pepsina por g de miel). Incubación: a 37 °C durante 30 min	pH 6 con pancreatina (1,645 mg por g de miel) amiloglucosidasa (86 unidades por g de miel) Incubación: 2h a 37 °C	Fermentación colónica: Cámara anaeróbica (5% CO ₂ , 5% H ₂ y 90% N ₂) 24 h/ 37 °C. incubación: 16 h con heces.	(Parkar et al., 2017)
9 mieles de mielada. Tres mieles de mezcla	1,75 g de miel	pH 2,2 con HCl Enzimas: solución gástrica (pepsina 2,7 mg/ g de miel) Incubación: a 37 °C con agitación (100 rpm) durante 2h.	pH 5,5 con NaHCO ₃ y a 6,7 posteriormente Medio: solución duodenal: pancreatina (8,3 mg por g de miel), glicodesoxicolato (1,6 mg por g de miel) tauroclorato, (1,7 mg/ g de miel) taurodesoxicolato (1 mg/g de miel) y NaOH. Incubación: agitación (100 rpm) 37 °C/2 h		(Seraglio et al., 2017)
Miel de producción ecológica	20 ml de muestra. No define dilución	pH 2,2 con HCl Enzimas: 16 g/100 ml de pepsina Incubación: a 37 °C con agitación durante 2 h	pH 7,5 con NaOH Medio: 0,5 g de pancreatina y 3,13 g de sales biliares en 125 ml de NaHCO ₃ Incubación: 2 h a 37 °C Diálisis a través de una membrana		(Costa et al., 2019)
1 muestra comercial de miel de manuka	10 g de miel a 100 ml de agua miliQ.	pH 2 con HCl Enzimas: pepsina de mucosa gástrica porcina (0,7 mg por g de miel) Incubación: 37 °C con agitación durante 2 h	pH 7,8 con NaHCO ₃ Medio: La fracción gástrica se mezcla con agua destilada, sales biliares porcinas (56,2 mg) y pancreatina de origen porcino (9 mg). Incubación: 2h a 37 °C en baño de agua.		(Cianciosi et al., 2020)

LA DIGESTIÓN IN VIVO

El estudio de la correlación entre los métodos de digestión *in vitro* e *in vivo* es de vital importancia. Los ensayos de digestión *in vitro* como se ha mencionado anteriormente no permiten reproducir ciertas situaciones de la digestión *in vivo*, como el control hormonal y nervioso, la actividad de las células mucosas, los movimientos peristálticos, los mecanismos de retroalimentación e implicación del sistema inmune. Los modelos *in vivo* han de llevarse a cabo en humanos o animales, principalmente ratas y cerdos albergando delicadas cuestiones éticas y gran controversia, además de resultar más costosos y prolongados (Lucas González 2016).

En los estudios en humanos, el número de individuos implicados suele ser muy pequeño, y se dificulta la obtención de datos extrapolables a la población. Existen muchos factores individuales que afectan al comportamiento del aparato digestivo, como sexo, edad, estado anímico, presencia o ausencia de patologías, actividad física y genética. Además, la localización geográfica de las poblaciones de estudio también es relevante, porque diferentes grupos poblacionales presentan comportamientos diferentes en la absorción, digestión o asimilación de los nutrientes (Minekus et al., 2014).

La biodisponibilidad *in vivo* de los compuestos bioactivos puede compararse valorando la excreción urinaria de sus metabolitos (para polifenoles solubles en agua como isoflavonas) (Bohn et al., 2013), por su aparición plasmática a lo largo del tiempo (AUC) (Guo et al., 2014), o mediante el método del balance fecal (Erk et al., 2014). Según Carbonell-Capella et al. (2014) la aparición plasmática a lo largo del tiempo es la que mejor refleja la biodisponibilidad de los polifenoles. Algunos métodos que han investigado la recuperación de los polifenoles totales después de la digestión *in vitro* por el método Folin-Ciocalteu, al ser contrastados con su biodisponibilidad *in vivo* (estimada por la aparición en orina o en plasma AUC), han mostrado resultados que parecen estar en el mismo rango de disponibilidad, aunque es difícil comparar los resultados por la variación en el número de dosis administradas y las diferentes medidas de biodisponibilidad (Bohn et al., 2018).

Otros estudios revelan una moderada pero significativa correlación para predecir la absorción de polifenoles entre la digestión colónica *in vitro* y la disponibilidad humana *in vivo* determinada por excreción por vía urinaria (Vetrani et al., 2016). Este estudio se basó en más de 70 individuos que consumieron una dieta rica en polifenoles durante 8 semanas. Las investigaciones realizadas hasta el momento ponen de manifiesto una falta de correlación entre los resultados de la digestión *in vitro* e *in vivo*, así como las limitaciones de la técnica (Hasjim et al., 2010). Por ello, es necesario optimizar y validar los modelos de digestión *in vitro* con ensayos de digestión *in vivo*, para determinar sus limitaciones y utilidades (Guerra et al 2012).

En mieles se han realizado muy pocos estudios *in vivo*, demostrando que algunos compuestos fenólicos de la miel y sus metabolitos llegan al torrente sanguíneo. Zhao et al. (2019), observaron que al administrar tres dosis de 200 mg de extracto de polifenoles de miel

por kg de peso vivo durante 24 h a ratas macho Sprague-Dawley, aumentaron las concentraciones séricas de 2,4-ácido dihidroxibenzoico, ácido homovanílico, ácido fenoxiacético, ácido abscísico y vainillina. En cambio, el ácido gálico se cuantificó en el extracto de miel, pero no en el suero de rata. Ishisaka et al. (2017) realizaron un estudio sobre el metabolismo *in vivo* de la leptosperina y el siringato de metilo de miel de manuka mostrando que después del consumo de 15 g de esta miel, los metabolitos derivados del siringato de metilo y la leptosperina se cuantificaron tanto en plasma como en orina de voluntarios sanos (n = 3). Schramm et al. (2003) observaron en adultos sanos que consumieron 1,5 g de miel de trigo sarraceno por kg peso vivo un aumento significativo en el contenido de fenoles totales en plasma después del consumo de miel. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en el plasma para los ácidos fenólicos investigados (ácidos 4-hidroxibenzoico y 4-hidroxicinámico), lo que sugiere una baja absorción a niveles indetectables por HPLC o metabolismo rápido o distribución en lugares en el cuerpo humano diferentes al plasma.

A pesar de que estos estudios aportan importantes avances en la investigación del efecto de la digestión sobre los compuestos fenólicos de la miel, es necesario profundizar en la investigación ampliando el número de muestras; tipo de miel; uso de un protocolo de digestión *in vitro* y realizar más estudios *in vivo*.

1.3. MÉTODO DIRECTO-SIN EXTRACCIÓN (QUENCHER)

Además de los métodos descritos, en alimentos sólidos existe un método directo, sin extracción, para valorar la actividad antioxidante de los alimentos, llamado QUENCHER (Rápido, Fácil, Nuevo, Barato y Reproducible), y que ha sido desarrollado por Gökmen et al (2009). Se basa en la medición directa de muestras sólidas mezclándolas con los radicales libres seguida de una medición espectrométrica posterior. Evita el paso crítico y tan prolongado de la extracción e hidrólisis previa a la medición de la capacidad antioxidante. Se basa en que las reacciones químicas tienen lugar a cualquier temperatura, siempre y cuando los reactivos sean capaces de colisionar. Por lo tanto, no hay necesidad de mezclar las soluciones líquidas de dos compuestos para que tenga lugar la reacción. Esto se puede aplicar a las reacciones utilizadas para la medición de la actividad antioxidante, independientemente de los mecanismos químicos del ensayo (Gökmen et al., 2009). Este método tiene la ventaja de considerar el alimento en su totalidad, frente a la extracción química o fisiológica donde siempre habrá una fracción insoluble que será descartada, pudiendo subestimar las propiedades o compuestos analizados. Este procedimiento se puede acercar a la digestión *in vitro* siempre que se analice la Respuesta Antioxidante Global como la suma de la fracción soluble (bioaccesible) e insoluble (no bioaccesibles) (Pastoriza et al., 2011).

Sin embargo, este tipo de análisis, aunque ha dado buenos resultados en otros alimentos como remolacha, carne, cacao y especias (Carrillo et al., 2017a; Carrillo et al., 2017b; Ramos et al., 2021; Dziurka et al., 2021) no se han utilizado en la miel, al no ser realmente un producto

sólido, ni poderlo liofilizar como se menciona en el caso de otros trabajos, sin la utilización de coadyuvantes que podrían interferir en los análisis.

2. OBJETIVO

El objetivo de este estudio fue analizar, de forma cualitativa-cuantitativa, los fenoles y flavonoides totales, y evaluar las actividades antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana de 15 mieles antes y después de la digestión *in vitro*, así como sus extractos metanólicos, para determinar si la digestión gastrointestinal y/o la extracción química pueden modificar las propiedades funcionales de las mieles crudas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MUESTRAS

Para evaluar la influencia de los distintos procedimientos de extracción en las propiedades biológicas de la miel se han seleccionado 15 muestras de miel de las 30 iniciales. Estas muestras coinciden con las empleadas en el estudio de componentes fenólicos y aparecen recogidas en la Tabla 4.

3.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

La etapa más decisiva para la recuperación y el aislamiento de los compuestos fenólicos antes de su análisis es la extracción (Gómez Romero, 2010). Esta extracción puede ser química o fisiológica.

3.2.1. *EXTRACCIÓN QUÍMICA*

Se realizó una extracción en fase sólida utilizando Amberlita XAD-2 como resina polimérica, en vez de los cartuchos comerciales utilizados para el análisis del perfil fenólico por HPLC ya que se necesitaba un mayor volumen de cada muestra.

REACTIVOS:

HCl concentrado (VWR International Eurolab)

Resina Amberlite XAD-2 (Supelco, Bellefonte, PA, EE.UU.)

Metanol (VWR International Eurolab)

Metanol HPLC (VWR)

MATERIALES:

Columnas cromatográficas de vidrio (Pobel Madrid Spain)

Rotavapor Büchi R-124

PROCEDIMIENTO:

La extracción de la fracción fenólica total se ha realizado según el método descrito por Baltrušaitytė et al. (2007) obteniendo los extractos metanólicos de cada una de las mieles (ME1-ME15). Se disolvieron 25 g de cada miel en 250 ml de agua destilada ajustándose a pH 2 con HCl concentrado. La solución se pasó lentamente por una columna (300 x 15 mm) con resina Amberlite XAD-2 preacondicionada con metanol y agua destilada. Tras pasar la muestra por la columna, se lavó con 250 ml de agua acidificada (pH 2 con HCl) y posteriormente para eliminar todos los azúcares y demás compuestos polares de la miel, se lavó con 300 ml de agua destilada neutra. Los compuestos fenólicos se eluyeron del solvente con 250 ml de metanol y se concentraron en rotavapor hasta sequedad, llevándolos posteriormente a 25 ml con metanol con grado de pureza HPLC. Los extractos metanólicos se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

3.2.2. EXTRACCIÓN FISIOLÓGICA-DIGESTIÓN

REACTIVOS:

Agua mili-Q (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.)

α -amilasa (Sigma-Aldrich).

CaCl₂ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

HCl (VWR)

Pepsina (Sigma-Aldrich).

NaHCO₃ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

Pancreatina (Sigma-Aldrich).

Sales biliares (Sigma-Aldrich).

MATERIALES:

Baño termostático de agua

Centrífuga

PROCEDIMIENTO:

Las 15 muestras fueron sometidos a procesos de digestión oral, gástrica e intestinal *in vitro*. Como es lógico, la primera etapa simuló una digestión oral, según el procedimiento propuesto por Pastoriza et al. (2011). Para ello, se pesaron 1,25 g de miel, se disolvieron en 10 ml de agua mili-Q y se añadieron 250 μ l de una solución de α -amilasa (3,25 mg de α -amilasa disuelta en 2,5 ml de CaCl₂ 1mM pH 7). La mezcla se incubó 30 minutos en baño de agua a 37°C con agitación de 110 oscilaciones/min. A continuación, se llevaron a cabo los procesos de digestión gástrica y digestión intestinal, a partir del procedimiento adaptado por Rufián-Henares y Delgado-Andrade (2009). En la digestión gástrica, se ajustó el pH a 2 con HCl 6N y se añadió 1 ml de una solución de pepsina (0,4 g de pepsina disuelta en 2,5 ml de HCl 0,1M). Las muestras se incubaron 2 horas en un baño de agua a 37°C con agitación a 110

oscilaciones/min. Para la digestión intestinal, se incrementó el pH a 6 con NaHCO_3 1 M y se añadió una solución de pancreatina y sales biliares (0,1 g de pancreatina + 0,625 g de sales biliares disueltos en 25 ml de NaHCO_3 0,1M). Luego se ajustó el pH a 7,5 con NaHCO_3 1M y se incubaron las muestras 2 horas en un baño de agua a 37°C con agitación a 110 oscilaciones/min. Tras estos procesos, las enzimas digestivas fueron inactivadas por tratamiento térmico a 100°C durante 4 minutos. Las muestras se enfriaron y se centrifugaron a 3550 rpm durante una hora a 4°C para separar las fracciones bioaccesibles (solubles) y no accesibles (insolubles). Los análisis posteriores se realizaron únicamente en la fracción soluble (DH1-DH15) debido a la cantidad mínima que se obtuvo de la fracción insoluble. Se hizo un blanco de digestión con agua miliQ, cuyos resultados se restaron a los obtenidos en las muestras para eliminar la interacción de los enzimas utilizados en la digestión.

3.3. FENOLES Y FLAVONOIDES

Los fenoles totales se midieron en las muestras de miel cruda (RH1-RH15), en los extractos metanólicos (ME1-ME15) y tras la digestión *in vitro* (DH1-DH15). Para el análisis de las muestras de miel cruda, previamente se realizó una dilución a 100 mg/ml con agua destilada. Después se filtraron todas las muestras con papel Whatman nº 40. Para el análisis de los extractos metanólicos y las muestras de miel digerida, se tomó el extracto o la fracción soluble obtenida tras la digestión *in vitro* directamente.

REACTIVOS:

Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich).

Carbonato de sodio (VWR International Eurolab)

Ácido Gálico (Panreac,)

Etanol (VWR International Eurolab)

AlCl_3 (Fluka Chemie GmbH, parte de Sigma-Aldrich, Buch, San Galo, Suiza)

Metanol (VWR International Eurolab)

Quercetina (Sigma-Aldrich)

NaNO_2 (Panreac)

NaOH (VWR International Eurolab)

Catequina (Panreac)

MATERIALES:

Espectrofotómetro Cary Bio 400 (Varian, parte de Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) (Figura 38)



Figura 36. Espectrofotómetro Varian UV-Visib

3.3.1. FENOLES TOTALES

El contenido de fenoles totales se valoró utilizando el método Folin-Ciocalteu (Meda et al., 2005). Se mezclaron 0,5 ml de muestra con 2,5 ml de reactivo Folin-Ciocalteu 0,2 N. Tras dejar reposar 5 minutos, se añadieron 2 ml de solución de carbonato de sodio (75 g/l), y las mezclas se mantuvieron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 120 minutos. Se preparó una curva de calibración de ácido gálico con un rango de concentración de 1 a 300 mg/l en etanol al 70%. Las muestras se analizaron por triplicado, midiendo la absorbancia a 760 nm. El contenido de compuestos fenólicos totales se ha expresado como mg de ácido gálico (GA)/100 g de miel.

3.3.2. FLAVONOIDES TOTALES

El contenido total de flavonoles se valoró espectrofotométricamente siguiendo el procedimiento de Pekal y Pyrzynska (2014). Se mezclaron 0,5 ml de cada muestra con 0,15 ml de NaNO_2 (5%, *p/v*), tras dejarlo en reposo 5 minutos, se añadieron 0,25 ml de AlCl_3 (2%, *p/v* en metanol). Se volvió a agitar, se dejó de nuevo en reposo durante 6 minutos y después se neutralizó con 0,25 ml de solución de NaOH 1 M. La mezcla se agitó y se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente. Se cuantificó la medida de la absorbancia a 510 nm frente a un blanco obtenido al sustituir el volumen de muestra por el mismo volumen de metanol para ME y de agua para RH y DH. Se realizó una curva patrón de catequina con un rango de concentraciones de 1-80 $\mu\text{g/ml}$. El contenido de flavonoides se expresó en mg de catequina (Cat)/100 g de miel.

3.4. PROPIEDADES BIOLÓGICAS

3.4.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La oxidación es una reacción química que transfiere electrones o hidrógeno de sustancias a un agente oxidante. La pérdida de uno o más electrones de moléculas, generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos, genera radicales libres responsables de las reacciones en cadena que dañan a las células y provocan estrés oxidativo. Los antioxidantes previenen o retrasan esta pérdida, minimizando con ello la

formación de radicales libres en las células (Pala y Gürkan, 2008). Los antioxidantes son a menudo agentes reductores como tioles, ácido ascórbico o polifenoles (Sies, 1997). Los antioxidantes pueden actuar de forma diferente frente a distintos radicales, por ello es importante valorar la actividad antioxidante de las sustancias o alimentos frente a distintos radicales. En este estudio se evaluó la actividad antioxidante frente a tres radicales libres: capacidad antioxidante equivalente a Trolox frente al radical ABTS^{•+} (TEAC), actividad antioxidante frente al hidroxilo (AOA) y capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC).

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE MÉTODO TEAC

El método se basa en valorar la actividad que presentan algunos componentes de la miel para inhibir el radical 2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS^{•+}). Se mide la pérdida de color cuando un antioxidante se añade al cromóforo azul-verde ABTS^{•+}, ya que el antioxidante reduce ABTS^{•+} a ABTS, decolorándolo (Moharram y Youssef 2014).

REACTIVOS:

2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS) (Sigma-Aldrich).

Persulfato de potasio (VWR International Eurolab)

Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich).

MATERIALES:

Espectrofotómetro (Varian)

PROCEDIMIENTO:

En este procedimiento, descrito por Sancho et al. (2016) se utilizó ABTS, como fuente de radicales libres. El catión radical ABTS^{•+} se produjo mediante la reacción (1:1) de 7 mM de solución madre de ABTS con 2,45 mM de persulfato de potasio en la oscuridad durante 16 h. Luego, la solución ABTS^{•+} se diluyó con agua para obtener una absorbancia entre 0,70 y 0,80 a 734 nm. Un volumen de 1490 µl de ABTS^{•+} se mezcló con 10 µl miel (RH), de extracto metanólico (ME) o extracto de digestión (DH). Las muestras de miel fueron evaluadas a una concentración de 500 mg/ml, mientras que los extractos (DH y RH) se adicionaron tal cual. Como patrón en la curva de calibración se usó Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) (0,625–3 mM), para el blanco se utilizó agua destilada en mieles y extractos de digestión y metanol en extractos metanólicos. Después de 6 min de reacción se midió la absorbancia de las muestras a 734 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición mediante la siguiente fórmula: % inhibición = $[(Ab-As) / Ab \times 100]$, donde Ab es la absorbancia del blanco, As la absorbancia de la muestra o de los patrones. Se representó el % de inhibición frente a la concentración mM de Trolox y los resultados se expresaron como

$\mu\text{mol Trolox (TE)}/100 \text{ g}$ de muestra para mieles y como $\mu\text{mol Trolox (TE)}/100 \text{ ml}$ para digestiones y extractos.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL MÉTODO AOA

Con este método se determina la capacidad para inhibir la producción de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) a partir del benzoato de sodio bajo la influencia de los radicales libres de oxígeno (radical hidroxilo, $\text{OH}\cdot$) derivados de la reacción de Fenton. Se puede medir espectrofotométricamente como la inhibición del desarrollo del color definido como el AOA (Actividad antioxidante frente al ácido úrico 1mM) (Koracevik et al., 2001).

REACTIVOS:

Fosfato monosódico, (NaH_2PO_4) (Scharlab, Sentmenat, España).

Fosfato disódico, (Na_2HPO_4) (Scharlab).

Benzoato de sodio (Alfa Aesar, parte de Thermo Fisher, Kanderl, Alemania).

FeSO_4 (VWR International Eurolab)

EDTA (VWR International Eurolab)

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Sigma-Aldrich).

Ácido acético (VWR International Eurolab)

Ácido tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich).

NaOH (VWR International Eurolab)

Ácido úrico (Alfa Aesar).

MATERIALES:

Espectrofotómetro (Varian)

Baño de agua

PROCEDIMIENTO:

La actividad antioxidante frente al radical hidroxilo de las muestras se determinó utilizando el método descrito por Koracevic et al. (2001). Las muestras (10 μl de miel a 750 mg/ml, extractos metanólicos y extractos de digestión tal cual) se mezclaron con 490 μl de tampón de fosfato de sodio (0,1 M, pH 7,4), 500 μl de benzoato de sodio (0,01 M), 200 μl de FeSO_4 -EDTA (2 mM) y 200 μl de peróxido de hidrógeno (0,01 M). Tras 1 h de incubación a 37 °C, se detuvo la reacción agregando 1 ml de ácido acético (20%). Posteriormente se añadió 1 ml de ácido tiobarbitúrico (0,8% p/v) en NaOH (50 mM). La solución se hirvió durante 10 min y luego se enfrió en hielo. La absorbancia se midió a 532 nm frente a agua destilada. Cada muestra (A1) tuvo su propio control (A0), en el que se añadió ácido acético (20%) antes de Fe-EDTA y H_2O_2 . Para cada serie de análisis, se preparó un control negativo (K1 y K0), donde las muestras fueron reemplazadas por tampón de fosfato. Se utilizó como patrón ácido úrico 1 mM en NaOH (5 mM) (U1 y U0). La actividad antioxidante se calculó como $\text{mmol de ácido úrico (AU)}/100 \text{ g de miel} = f \times (\text{CU}) \times (\text{K-A})/(\text{K-U})$, donde f es el factor de dilución, CU es la

concentración de ácido úrico (1 mM), K es la absorbancia del control (K1-K0), A es la absorbancia de la muestra (A1-A0) y U es la absorbancia de la solución de ácido úrico (U1-U0).

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO ORAC

Este método mide la inhibición de la oxidación inducida por radicales peroxilo generados por 2,2'-azobis(2-amidinopropano)- dihidrocloruro (ABAP). Cuando un generador de radicales libres como (ABAP) se agrega a la fluoresceína, estos radicales dañan la molécula fluorescente y provocan la pérdida de fluorescencia. Mediante curvas de fluorescencia se registra la pérdida de intensidad frente al tiempo. Se determina la actividad antioxidante comparando el área de la curva de las muestras frente al área obtenido en una curva estándar usando un antioxidante, el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), un ácido soluble en agua análogo de la vitamina E (Moharram y Youssef 2014).

REACTIVOS:

KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich)

Na_2HPO_4 (Scharlab)

Tampón fosfato 75 mM, pH 7,4

Fluoresceína (Fluka Chemie GmbH)

2,2'-azobis(2-amidinopropano)- dihidrocloruro (ABAP) (Sigma-Aldrich)

Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich)

MATERIALES:

Microplacas blancas de poliestireno de 96 pocillos (Brand, Wertheim, Germany)

Espectrofluorímetro Lector de microplacas Varioskan LUX (Thermo Fisher, Kanderl, Alemania) (Figura 39)



Figura 37. Fluorímetro Lector de microplacas Varioskan LUX

PROCEDIMIENTO:

El método ORAC se ha llevado a cabo mediante el procedimiento modificado de Huang et al. (2002), utilizando microplacas blancas de poliestireno de 96 pocillos. En cada uno de los pocillos se añadieron los reactivos correspondientes según se tratara del control negativo (control), control positivo (con antioxidante Trolox), de muestra o de blanco (Tabla 15). En los

pocillos control no se añade ni el Trolox ni la muestra, mientras que en los pocillos de Trolox no se añade muestra y en los pocillos de las muestras y blanco no se añade Trolox y las muestras se deben preparar en la dilución correspondiente utilizando el tampón. Todos los pocillos tenían un volumen final de 200 μ l.

Tabla 15. Cantidad de reactivo añadido a cada pocillo en la microplaca para el análisis del ORAC

	Control	Trolox	Muestra	Blanco
Tampón fosfato 75 mM pH 7,4 (μl)	187	181	-	-
Trolox 0,2 mM (μl)	-	6	-	-
Muestra μL	-	-	187*	187**
Fluoresceína 4,1 μM (μl)	3	3	3	3
Agitar y comprobar la señal para ajustar condiciones				
ABAP 0,37 M (μl)	10	10	10	10
Agitar e inmediatamente iniciar la medida				

* Se preparó previamente un tubo tipo eppendorf por muestra con 933 μ l de tampón + 1 μ l de muestra y de ahí se tomaron los 187 μ l para cada pocillo (cuatro réplicas por muestra). Tendremos 0,2 μ l de muestra realmente en cada pocillo. La muestra se preparó a una concentración de 100 mg/ml para las mieles, los extractos metanólicos (ME) se añadieron tal cual y los extractos de digestión (DH) se diluyeron 30:70 en agua miliQ.

** Blanco: 933 μ L tampón + 1 μ L de metanol o agua (según en qué disolvente estén las muestras) o 1 μ L del blanco de digestión.

Después de añadir los 3 μ l de fluoresceína (4,1 μ M), la placa se agitó automáticamente en el espectrofluorímetro durante 3 minutos y realizando una medida inicial de la fluorescencia, posteriormente se agregaron 10 microlitros de solución ABAP (0,37 M) en cada pocillo y la curva de decaimiento de la fluorescencia se midió cada 5 minutos durante 90 min a 37°C a longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 520 nm, respectivamente. Todas las muestras se analizaron por cuadruplicado; en cada placa evaluada también se analizó un control negativo y otro positivo con Trolox. Los resultados fueron calculados usando la siguiente ecuación:

$$\frac{\mu\text{mol}}{\text{g de muestra}} = \frac{\text{Área neta de muestra}}{\frac{\text{Área neta de Trolox}}{\mu\text{mol Trolox}}} \times \text{Factor de dilución}$$

El área neta se ha calculado para cada muestra y para el trolox, restando el área bajo la curva del control (Figura 40). El cálculo del área de los datos se realizó utilizando el programa Origin Pro8 SR2 (Origin Lab Corporación, EEUU). Los μ mol de Trolox se calcularon teniendo en

cuenta la concentración de Trolox 0,2 mM (0,0002 mol en 1l), en 6 μ l que es lo que se añadió de Trolox en el pocillo, en total fueron 0,0012 μ mol.

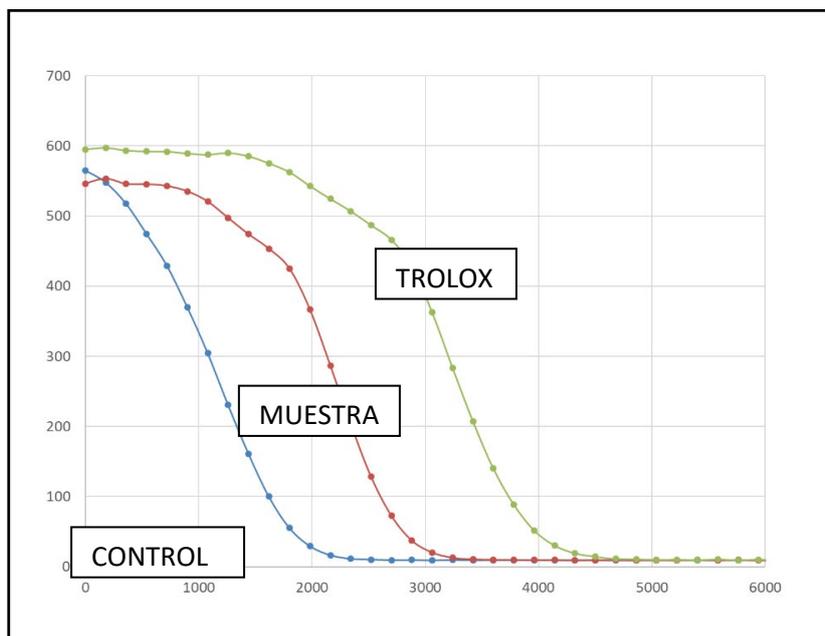


Figura 38. Ejemplo de la representación de la fluorescencia de las muestras para el cálculo del área bajo la curva

Los resultados se expresaron como μ mol T/g de miel y en extractos y digestiones como μ mol T/ ml de muestra.

3.4.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

El estudio de la actividad antimicrobiana de las 15 mieles (RH1-RH15), 15 extractos metanólicos (ME1-ME15) y 15 extractos fisiológicos, obtenidos después de la digestión *in vitro* (DH1-DH15) se midió frente a seis microorganismos mediante la evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI, en inglés MIC) utilizando el método de microdilución en caldo.

CEPAS MICROBIANAS:

BACTERIAS:

Escherichia coli CECT 99

Listeria monocytogenes CECT 934

Pseudomonas aeruginosa CECT 108

Streptococcus mutans CECT 479

Staphylococcus aureus CECT 435

LEVADURA:

Candida albicans CECT 1394

REACTIVOS:

Agar base de Baird Parker (BP) (VWR International Eurolab)
Agar base de Microinstant Listeria (Ottaviani and Agosti) (MLA) Scharlab
Agar de Triptona con bilis x-glucurónido (TBX, VWR International Eurolab)
Caldo nutritivo No. 2 (NB) (Oxoid, parte de Thermo Fisher, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido)
Caldo de extracto de malta (MEB) (Oxoid)
Infusión cerebro-corazón (BHI) (Oxoid)
Agar técnico No. 1 (Oxoid)
Solución de Ringer (Oxoid)

MATERIALES:

Microplacas de 96 pocillos de poliestireno con fondo redondo (Brand)
Placas Petri 90 cm diámetro (VWR International Eurolab)
Asas de siembra plástico estéril de 1 y 10 µl (VWR International Eurolab)
Espátula de Drigalski estéril (VWR International Eurolab)

PROCEDIMIENTO:

CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS

En el caso de *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans*, para el crecimiento de los microorganismos se utilizaron cultivos liofilizados, y en el caso de *E. coli*, *L. monocytogenes* y *St. mutans*, se emplearon cultivos congelados en glicerol. Los microorganismos se sembraron en placas Petri con el medio de cultivo en agar específico para cada microorganismo y en tubos de ensayo con el caldo de cultivo específico.

Los medios de cultivo utilizados fueron:

Caldo de cultivo No.2 y Agar nutritivo para *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

Infusión y agar cerebro-corazón para *L. monocytogenes* y *St. mutans*.

Caldo y agar de extracto de malta con 2% de glucosa para *C. albicans*.

Las bacterias fueron incubadas a 37°C durante 24h, mientras que la levadura se incubó a 25°C durante 24h. Para comprobar la concentración de microorganismos después de la incubación, se hicieron diluciones decimales en tubos de ensayo con Ringer. Se sembraron las diluciones necesarias en placas con medio de cultivo en agar y se incubaron durante 24h. Los recuentos se realizaron al día siguiente.

Para evaluar la actividad antimicrobiana la suspensión inicial (aproximadamente 8-9 log ufc/ml) fue diluida en tubos de Ringer hasta obtener un recuento de células de 6 log ufc/ml.

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Para evaluar la actividad antimicrobiana se empleó el método de microdilución en caldo, determinando la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida que se definen de la siguiente manera:

Concentración mínima inhibitoria (CMI, en inglés MIC) es la concentración más baja de un agente antimicrobiano que impide el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación (Horna et al., 2005).

Concentración mínima bactericida (CMB, en inglés MBC) es la mínima concentración de un agente antimicrobiano que elimina eficazmente a más del 99,9% de los microorganismos viables después de 24 horas de incubación (Horna et al., 2005).

Para evaluar las actividades antimicrobianas se emplearon placas de microdilución de poliestireno de fondo redondo de 96 pocillos estériles. Se analizaron las siguientes concentraciones:

Miel cruda: 37,5%, 18,75%, 9,38%, 4,69%, 2,34%, 1,17% y 0,59% (p/v). En el caso de *C. albicans*, al comprobar que la miel tenía menor efecto antimicrobiano sobre ella, se analizaron otras concentraciones más elevadas de miel: 45%, 41%, 37,5%, 18,75%, 9,38%, 4,69% y 2,34% (p/v).

Extractos metanólicos: 90%, 75%, 60%, 45%, 30%, 15% 5% y 1% (concentración de miel de 450 a 5 mg/100ml).

Extractos obtenidos después de la digestión *in vitro*: 90%, 75% 60%, 50%, 40%, 25%, 12,5% y 5% (concentración de miel entre 7,04 y 0,40 mg/100 ml). En este caso no fue posible utilizar concentraciones de miel más altas, porque en la fracción soluble obtenida después de la digestión, la concentración de miel ya era de 7,82% (1,25 g en 16 ml de fracción soluble).

Se realizaron todas las diluciones de las muestras utilizando el caldo de cultivo adecuado para cada microorganismo. Se prepararon tubos Eppendorf con 900 µl de cada dilución para cada muestra y para cada microorganismo. Para el control de contaminación para cada muestra se agregaron 180 µl de cada dilución de Eppendorf junto con 20 µl de Ringer a una columna de la placa de 96 pocillos (columnas 4, 8 y 12 de la placa, Figura 41). Una vez retirados los 180 µl se añadieron 80 µl de cada microorganismo (6 log ufc/ml) a los 720 µl de cada dilución de muestra. En cada pocillo, se agregaron 200 µl de la mezcla (tres repeticiones por dilución, ocho diluciones). También se prepararon pocillos de control que contenían únicamente caldo de cultivo y microorganismo (control positivo) y pocillos que contenían caldo de cultivo con microorganismo y con lejía (control negativo). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas para bacterias y a 25 °C para *C. albicans*. La MIC se determinó como la concentración mínima a la que no se observó visualmente crecimiento del microorganismo después de 24h de incubación.

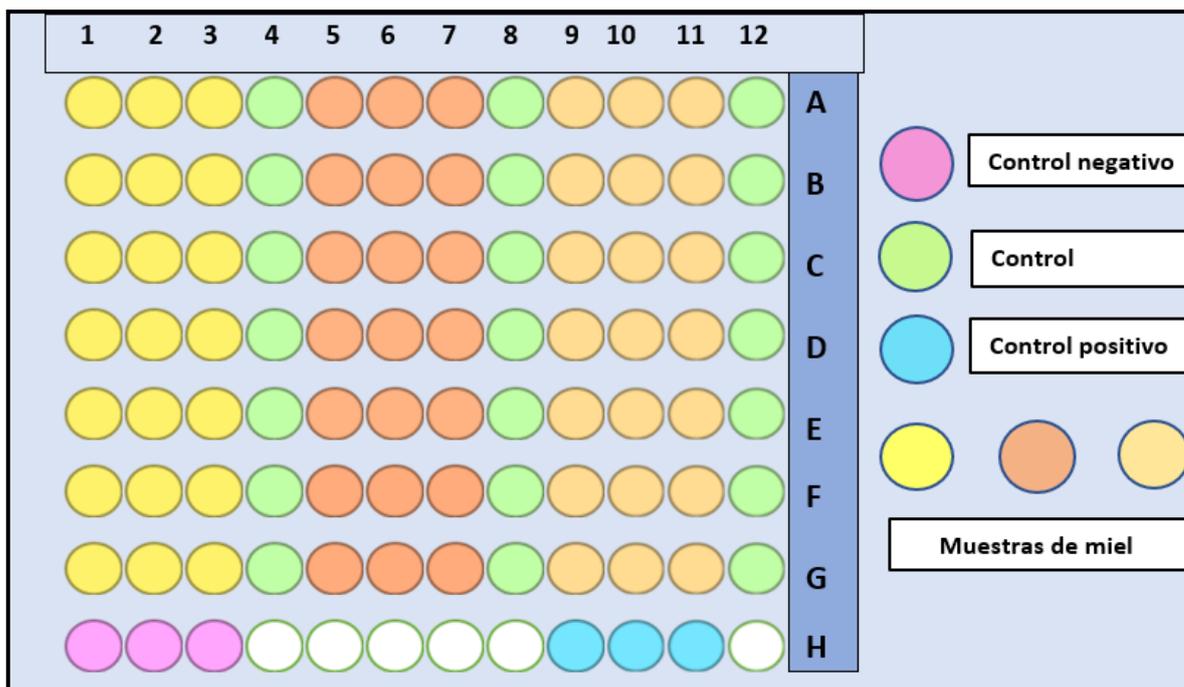


Figura 39. Esquema de la placa de 96 pocillos para evaluar la actividad antimicrobiana. A es la máxima concentración y G la mínima

Para conocer la MBC, se pasó 10 μ l de la suspensión existente en cada pocillo en la que no se había observado crecimiento, así como la primera que sí que tenía crecimiento a placa Petri con agar específico para cada microorganismo (TBX para *E. coli*, MLA para *L. monocytogenes*, BP para *S. aureus*, NA para *St. mutans* y *Ps. aeruginosa* y MEA para *C. albicans*) y se incubaron las placas a 37°C durante 24 horas (*C. albicans* a 25°C). La CBM se determinó como la mínima concentración de miel en la que no se observó crecimiento de colonias en las placas tras 24 horas de incubación en medio agar selectivo.

3.4.3. ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA

El método para evaluar la actividad antiinflamatoria fue la inhibición del enzima hialuronidasa. Este método fue descrito por Ferreres et al. (2012) y está basado en la reacción de Morgan-Elson, se fundamenta en la reacción catalizada por el enzima hialuronidasa de hidrólisis del ácido hialurónico. En esta reacción se libera N-acetil-D-glucosamina con extremo reductor, el cual, se transforma a 100°C y en condiciones alcalinas a cromógeno I y II (configuración alfa y beta respectivamente). Después tras la acción de los ácidos añadidos, se transforman en cromógeno III. Este compuesto, se deja reaccionar con el paradimetilaminobenzaldehido (PDMB) y forma el color morado final de la reacción (Figura 42). Finalmente se mide espectrofotométricamente, a una longitud de onda de 586 nm, la cantidad de μ moles de N-acetil-D-glucosamida formados (Takahashi et al., 2003).

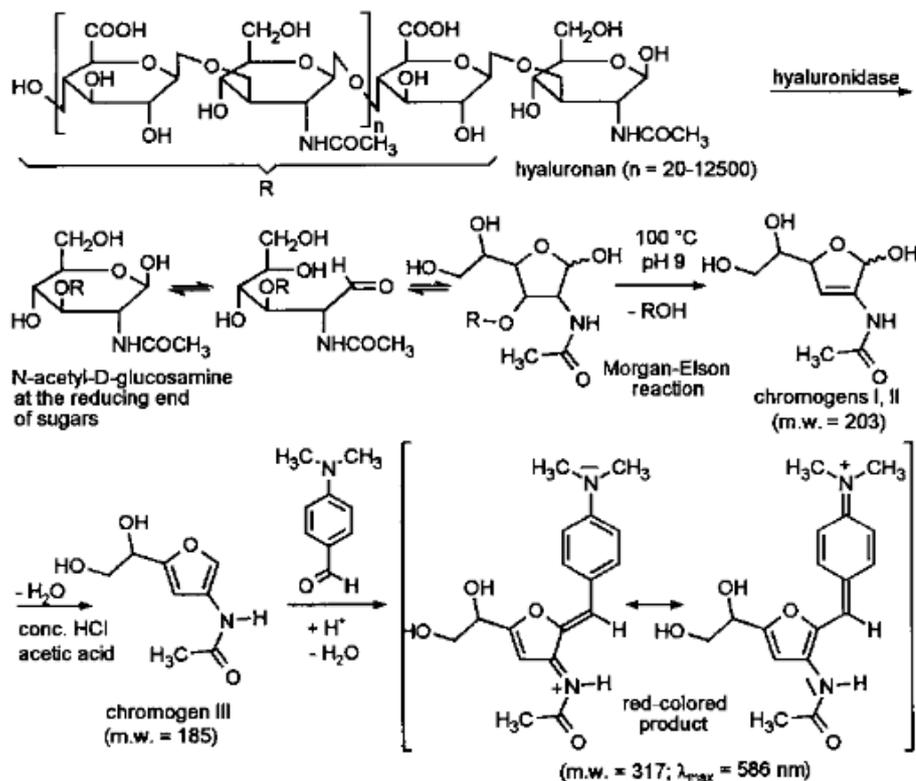


Figura 40. Reacción de Morgan-Elson de acuerdo con Muckenschnabel et al. (1998)

REACTIVOS:

- N-acetil-D-glucosamina (NAG) (Sigma-Aldrich)
- Sal sódica de ácido hialurónico (Sigma-Aldrich)
- NaCl (VWR International Eurolab)
- Albúmina de suero de bovino (BSA) (Sigma-Aldrich)
- Hialuronidasa tipo IV-S (Sigma-Aldrich)
- Tetraborato de potasio (Alfa Aesar)
- Dimetilaminobenzaldehído (DMAB) (VWR International Eurolab)
- N-acetil-D-glucosamina (NAG) (Sigma-Aldrich)

MATERIALES:

- Baño termostático de agua
- Espectrofotómetro (Varian)

PROCEDIMIENTO:

La actividad antiinflamatoria se evaluó mediante un ensayo de inhibición de hialuronidasa modificado (Ferrerres et al., 2012). La actividad hialuronidasa se definió como una unidad (U)

de hialuronidasa que cataliza la liberación de 1 μmol de N-acetil-D-glucosamina (NAG) por minuto en condiciones específicas. Se preparó una solución madre de sal sódica de ácido hialurónico (5 mg/ml) y se almacenó a 4 °C. Para el ensayo, se añadieron 70 μl de solución madre de ácido hialurónico y 100 μl de tampón (formato de sodio 0,2 M, NaCl 0,1 M y BSA 0,2 mg/ml, pH 3,68) a 200 μl de agua milliQ y 50 μl de muestra (HR 750 mg/ml, EM y DH). La mezcla se calentó a 37 °C durante 10 min. Luego se inició la reacción agregando 50 μl de hialuronidasa tipo IV-S (1400 U/ml) preparada en NaCl al 0,9%, incubando la mezcla en baño maría durante 1 h a 37 °C y deteniendo la reacción enzimática por adición de 100 μl de tetraborato de potasio 0,8 M. Tras esto, las muestras se incubaron durante 3 minutos en un baño de agua hirviendo y luego se enfriaron a temperatura ambiente. Después se agregaron 750 μl de DMAB, los tubos se incubaron durante 20 min a 37 °C y finalmente se leyó la absorbancia a 586 nm frente a un blanco, en el que tanto la enzima como la muestra se reemplazaron por tampón. Las curvas de calibración se realizaron con soluciones patrón de NAG (en el rango entre 0 y 2 μmol por prueba). El porcentaje de inhibición de hialuronidasa se calculó de la siguiente manera: % de inhibición = $(A - B) / A \times 100$, donde A es μmol de NAG en el control positivo y B es μmol de NAG de cada muestra de reacción.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como media junto con su desviación estándar. En el análisis estadístico, para analizar las posibles diferencias existentes entre los resultados obtenidos para cada parámetro en función del tipo de miel y/o la extracción realizada, se realizó un análisis de normalidad para todos los parámetros. Para aquellos que cumplieran con la normalidad se realizó un test de múltiples rangos mediante el test LSD a un intervalo de confianza del 95%, mientras que aquellos parámetros que no cumplieran con el test de la normalidad se analizaron mediante un test de Kruskal-Wallis junto con el gráfico de cajas y bigotes. También se realizó el análisis de componentes principales (PCA) y correlaciones de Pearson para observar posibles correlaciones entre los parámetros estudiados y poder observar variables que agrupan a las muestras. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statgraphics Centurion XVIII (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, VA, EEUU).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES

Los fenoles totales en las muestras de miel cruda oscilaron entre 24 y 242 mg GA/100 g. En los extractos metanólicos, la variación fue de entre 4,9 y 25 mg GA/100 g. Tras la digestión *in vitro*, los valores oscilaron entre 108 y 211 mg GA/100 g (Figura 43). Tanto en las mieles crudas como en los extractos y en las muestras digeridas, el mayor contenido de fenoles

totales se obtuvo en las mieles de brezo, seguidas de las mieles de aliaga y el menor contenido se encontró en las mieles de viborera. Los valores de las mieles crudas fueron superiores a los resultados descritos en la bibliografía, donde se mencionan valores entre 12 y 140 mg GA/100 g en mieles de diferentes orígenes botánicos y geográficos (Ferreira et al., 2009; Socha et al., 2009). Valores similares a los nuestros fueron los descritos por Jara-Palacios et al. (2019) en mieles españolas de mielatos de roble (50,04-243,86 mg GA/100 g). Los resultados obtenidos en este trabajo para los extractos metanólicos fueron inferiores a los obtenidos por Almeida da Silva et al. (2013) en muestras de la Amazonia del norte de Brasil, con un contenido de fenoles totales que osciló entre 17 y 66 mg GA/g de extracto. Los valores más bajos de fenoles totales encontrados en los ME en comparación con las mieles crudas eran esperados, porque el método Folin-Ciocalteu también cuantifica otros compuestos reductores además de los fenólicos (Petretto et al., 2015). En todas las mieles, los compuestos fenólicos aumentaron significativamente tras la digestión *in vitro*, excepto en las tres mieles con mayor contenido fenólico H8, H9 y H12 (BR1, BR2 y BR5), en las que, tras el proceso de digestión, los fenoles totales disminuyeron. El valor de la digestión del blanco se consideró en los cálculos para eliminar las interacciones que el reactivo Folin-Ciocalteu pudiera tener con las enzimas utilizadas en la digestión. Sin embargo, no se eliminó la probable interacción de los azúcares con el reactivo de Folin-Ciocalteu, lo que podría ser la razón del aumento de este resultado. Mientras que Cianciosi et al. (2020) mostraron una disminución de seis veces en la cantidad de fenoles totales de la miel cruda a la miel después de la digestión *in vitro* y Rodríguez Romero (2012) mostró una disminución de diferentes compuestos fenólicos después de la digestión, Seraglio et al. (2017) no observaron diferencias después de la digestión gástrica, pero sí una disminución de los fenoles totales después de la digestión duodenal. En el estudio realizado por O'Sullivan et al. (2013), no hubo cambios significativos en los compuestos fenólicos tras la digestión *in vitro*, y en algunas mieles aumentaron ligeramente, como ocurrió en nuestro estudio. El efecto de una digestión *in vitro* sobre el contenido fenólico de un alimento varía en función de diversos factores, como la matriz alimentaria y las condiciones de digestión. Por lo tanto, es posible que se encuentren diferencias entre los diversos estudios (Seraglio et al., 2017). Los diferentes resultados obtenidos en este estudio en comparación con los de otros trabajos publicados se deberían probablemente al hecho de que algunos compuestos fenólicos podrían ser más sensibles que otros a los cambios de pH (Cianciosi et al., 2020) y a la diferente composición fenólica de las distintas mieles, ya que la mayor parte de las investigaciones se realizaron con mieles de Manuka, y sólo hay un estudio sobre mieles de mielada. Otra posible razón de los diferentes resultados podría ser la gran variedad de concentraciones utilizadas durante la digestión en los diferentes trabajos o porque en nuestro estudio se realizó la simulación de la fase oral, a diferencia de otros estudios.

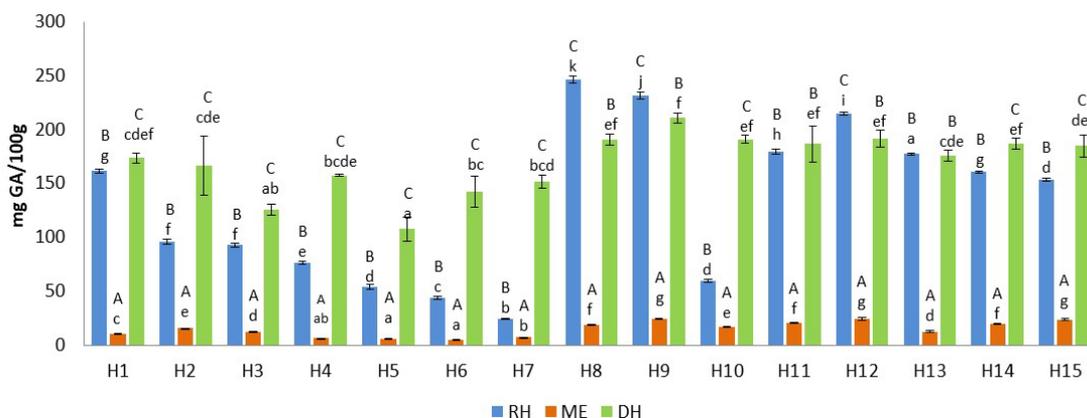


Figura 41. Fenoles totales expresados como mg de ácido gálico (GA)/100 g de miel de mieles crudas (RH), extractos metanólicos (ME) y extracto digestivo (DH). Las barras de error representan la desviación estándar de cada punto. Letras mayúsculas diferentes (A-C) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las extracciones comparando la misma muestra. Letras minúsculas diferentes (a-g) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras con la misma extracción

En cuanto a los flavonoides totales, las mieles con los valores más elevados, tanto en crudo como en relación con los extractos metanólicos y la digestión *in vitro*, fueron las mieles de brezo. Por el contrario, las mieles de viborera mostraron los valores más bajos de flavonoides totales. Los rangos de variación en las mieles crudas se situaron entre 5,4 y 25 mg Cat/100 g, en los extractos metanólicos entre 0,93 y 21 mg Cat/100 g y en los extractos de digestiones *in vitro* entre 0 y 16 mg Cat/100 g (Figura 44).

En la mayoría de las mieles se obtuvo un contenido de flavonoides totales significativamente mayor en las muestras de miel cruda que en los extractos metanólicos, lo que corrobora que los flavonoides de las mieles deben medirse en extractos alcohólicos para eliminar las interferencias (Sancho et al., 2016). Sólo ME10 (BR3) y ME12 (BR5) mostraron valores más altos que su correspondiente HR, probablemente porque el resultado depende de la composición específica de flavonoides de cada muestra. El contenido de flavonoides totales fue superior a los datos descritos por Osés et al. (2020) en extractos de mieles de madroño (2,2-6,8 mg Cat/100 g). Tras el proceso de digestión, los valores de los flavonoides totales fueron inferiores a los de las mieles crudas en todas las mieles, excepto en la DH 9, donde los flavonoides aumentaron ligeramente, pasando de 12,71 a 13,33 mg Cat/100 g de miel. Cianciosi et al. (2020) mostraron una disminución muy drástica (ocho veces) de los flavonoides tras la digestión, obteniendo 6,49 mg Cat/kg de miel.

Aunque hay un aumento de la cantidad de compuestos fenólicos totales tras la digestión *in vitro*, hay una disminución de los flavonoides, lo que podría estar relacionado con el hecho de que el método de Folin-Ciocalteu no es específico para los compuestos fenólicos, sino que mide diferentes sustancias reductoras (azúcares, proteínas), mientras que el procedimiento descrito para los flavonoides es más específico para flavonoides como la rutina, la luteolina y

las catequinas, aunque también puede medir algunos ácidos fenólicos Pekal y Pyrzynska (2014).

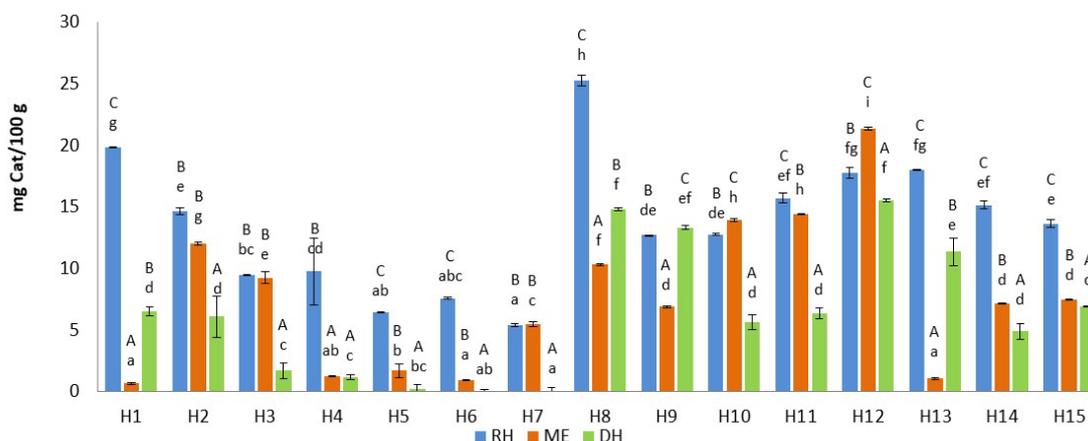


Figura 42. Flavonoides totales expresados como mg de catequina (Ct)/100 g de miel de mieles crudas (RH), extractos metanólicos (ME) y extracto digestivo (DH). Las barras de error representan la desviación estándar de cada punto. Letras mayúsculas diferentes (A-C) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las extracciones comparando la misma muestra. Letras minúsculas diferentes (a-g) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras con la misma extracción.

4.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

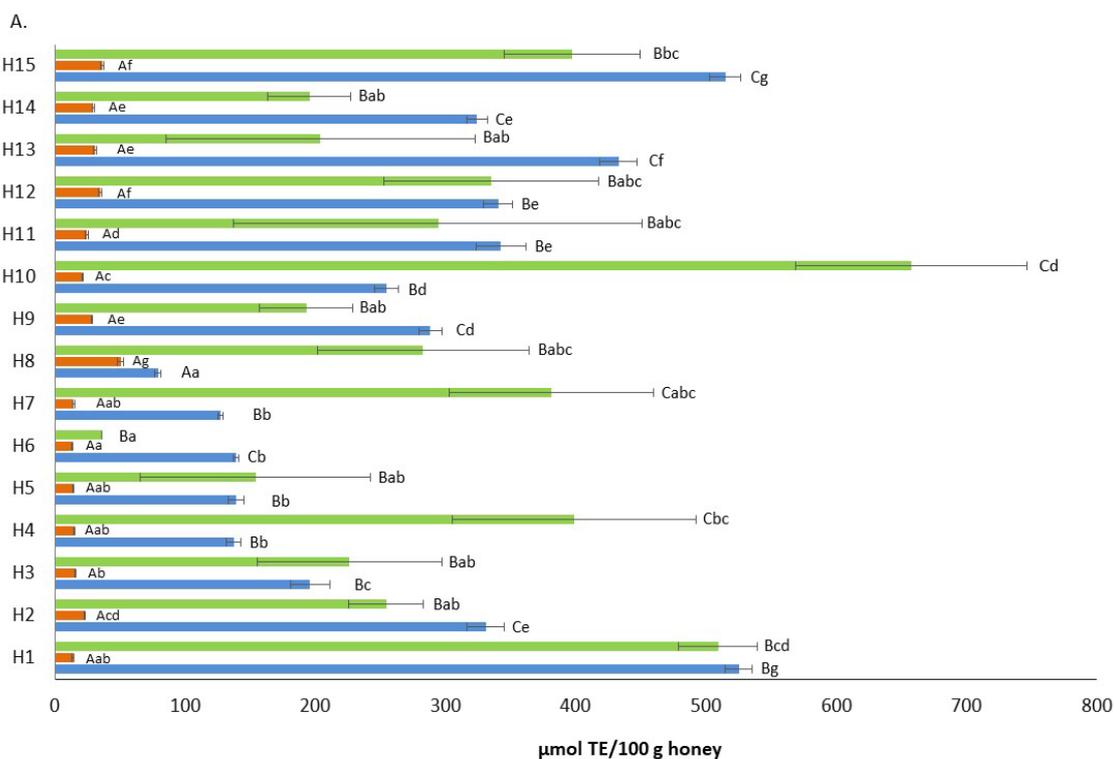
Las propiedades antioxidantes de las muestras de miel cruda, de los extractos y de las muestras sometidas a digestión, se evaluaron frente a diferentes radicales (Figura 45).

La actividad frente al radical ABTS^{•+} osciló entre 79,08 y 525,01 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ de miel. Estos valores fueron superiores a los obtenidos en mieles eslovacas, con valores que oscilaron entre 180 y 1110 $\mu\text{mol TE}/\text{kg}$ y para las mieles cubanas, cuyos resultados oscilaron entre 210 y 2940 $\mu\text{mol TE}/\text{kg}$ (Alvarez Suarez et al., 2010).

Al igual que los resultados del contenido fenólico total, las actividades antioxidantes fueron mayores en las mieles crudas y en las muestras sometidas a digestión que en los extractos metanólicos. A diferencia de los resultados de otros investigadores (O'Sullivan et al., 2013; Seraglio et al., 2017; Cianciosi et al., 2020), que informaron de una menor actividad de DPPH, FRAP o TEAC tras la digestión de la miel, nuestros resultados mostraron que las actividades antioxidantes analizadas aumentaron en las mieles sometidas a digestión. En otras matrices alimentarias, sí que se observa un aumento de la actividad antioxidante de la muestra tras la digestión, lo que se atribuye a la liberación de compuestos antioxidantes por la digestión enzimática (Carrillo et al., 2017a). Como en los compuestos fenólicos, las diferencias observadas en nuestro estudio podrían deberse a la inclusión de la simulación de la fase oral, que no se realizó en otros estudios. Cabe destacar la elevada desviación estándar de las actividades antioxidantes obtenidas en las mieles tras la digestión *in vitro*, de forma que en

algunos casos no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) respecto a los resultados en mieles crudas y digeridas *in vitro*. El mayor aumento de la capacidad antioxidante tras la digestión se produjo frente al radical hidroxilo (AOA), y el menor aumento se produjo frente al radical ABTS, frente al que sólo cinco de las muestras mostraron una mayor actividad tras la digestión *in vitro*. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos orígenes botánicos de la miel, salvo para indicar que, en general, los resultados fueron más bajos en las mieles de viborera (tanto en crudo, como en extracto metanólico y extracto tras la digestión), y los resultados fueron más altos en las mieles de mielada y de brezo.

Se observó una correlación significativa entre el ABTS, el ORAC y el AOA y el contenido en fenoles totales ($r = 0,7287$; $r = 0,7754$; $r = 0,4852$; $p < 0,05$) evaluando todas las muestras de miel y las tres extracciones diferentes ($n = 135$).



Resultados: Influencia de la extracción en las propiedades biológicas

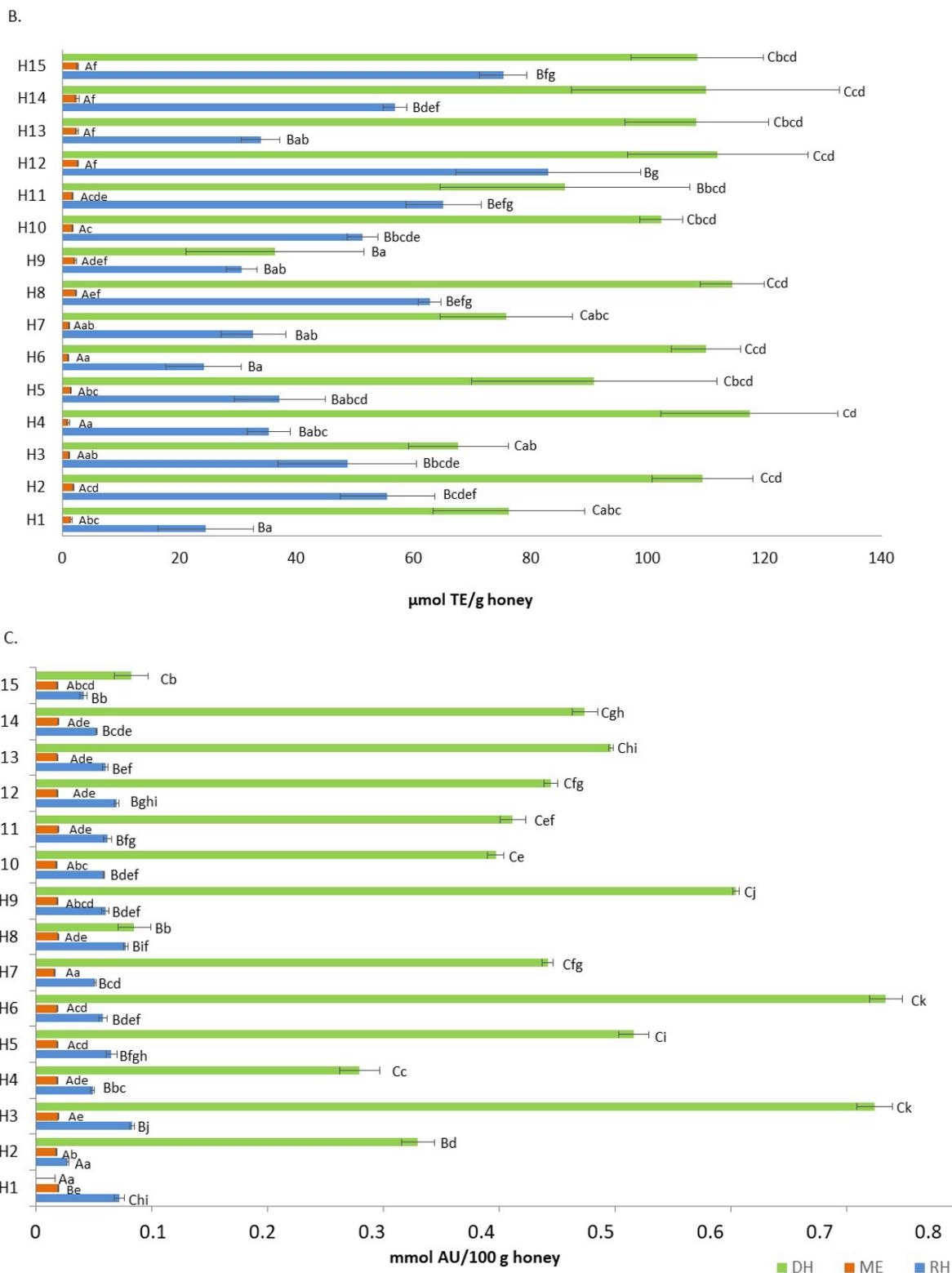


Figura 43. Actividad antioxidante de las mieles crudas (RH), los extractos metanólicos (ME) y el extracto digestivo (DH) frente a diferentes radicales (ABTS^{•+} (A), ROO[•] (B) y [•]OH (C)). Las barras de error representan la desviación patrón para cada punto de datos. Las letras mayúsculas diferentes (A-C) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las extracciones que comparan la misma muestra. Letras minúsculas diferentes (a-g) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras con la misma extracción.

4.3. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

En las mieles crudas estudiadas, la actividad inhibitoria de la hialuronidasa varió entre el 12 y el 85% para una concentración de miel de 750 mg/ml. En los extractos, los índices de inhibición variaron entre el 27 y el 83%. Tras la digestión, la inhibición de la hialuronidasa fluctuó entre el 0 y el 42% (Figura 46). La bibliografía también mostró que los valores de la actividad antiinflamatoria eran muy variables en función de la concentración de miel y de los compuestos fenólicos (Osés et al., 2020). En este caso, observamos una tendencia de inhibición similar entre la miel cruda y los extractos, con una actividad antiinflamatoria considerablemente reducida en la fracción soluble obtenida tras la digestión *in vitro*, lo que podría deberse a la disminución de los compuestos responsables de esta actividad durante el proceso de digestión de la miel.

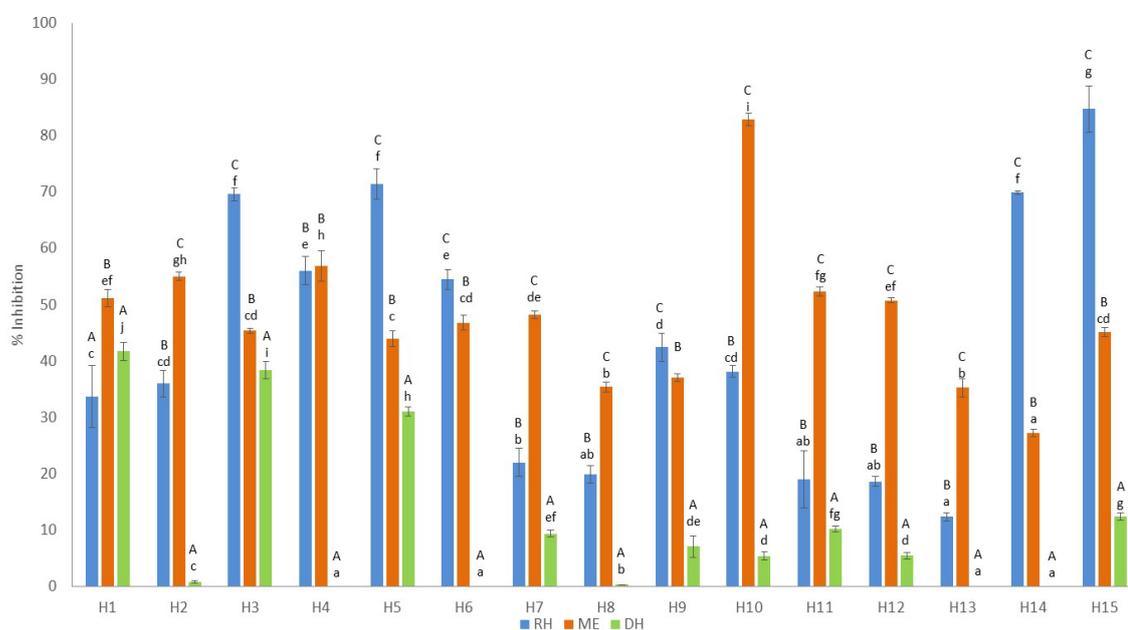


Figura 44. Actividad antiinflamatoria de las mieles crudas (RH), los extractos metanólicos (ME) y el extracto digestivo (DH). Las barras de error representan la desviación patrón para cada punto de datos. Las letras mayúsculas diferentes (A-C) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las extracciones que comparan la misma muestra. Letras minúsculas diferentes (a-g) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras con la misma extracción.

4.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Los resultados de la actividad antimicrobiana mostraron que todas las mieles presentaron actividad antimicrobiana contra los seis microorganismos evaluados. En la Tabla 16, los datos de la actividad antimicrobiana se expresaron como % de miel, extracto o fracción digerida soluble, con la correspondiente concentración de miel (g/100 ml) entre paréntesis para una mejor comparación de los resultados.

S. aureus fue el microorganismo más sensible a las 15 mieles analizadas, obteniendo MICs entre 4,69 y 9,38%. La levadura *C. albicans* fue la más resistente, contra la que sólo la miel 14 mostró un efecto bactericida (MBC) a una concentración del 45%, aunque todas las mieles mostraron actividad inhibitoria (MIC= 37,5%). La miel 2 (mielada) mostró el menor efecto inhibitorio contra todos los microorganismos. Los datos de MIC y MBC de las diferentes mieles coincidieron, excepto para *L. monocytogenes* y *C. albicans*, cuyas MBC fueron concentraciones más altas que la MIC.

Los datos de MIC y MBC obtenidos frente a *S. aureus* fueron comparables a los valores obtenidos por Osés et al. (2016). Este estudio también concluyó que mieles con orígenes botánicos similares mostraron actividades antimicrobianas diferentes, es decir, no se pudo observar ninguna relación entre el origen botánico y el efecto inhibitorio de las mieles contra cada uno de los microorganismos.

En cuanto a la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos, *L. monocytogenes* fue el microorganismo más sensible, mientras que *St. mutans* junto con *C. albicans* fueron los más resistentes. La MIC y la MBC obtenidas fueron concentraciones de extracto entre <1 y 15%, lo que corresponde a <5 a 75 g/100 ml. Por tanto, para todos los microorganismos evaluados, excepto para *L. monocytogenes*, la MIC fue mayor en los ME que en la HR, y por tanto se obtuvo una menor actividad antimicrobiana de los extractos en comparación con las mieles crudas. Con respecto a *L. monocytogenes*, los extractos metanólicos mostraron un mayor efecto antimicrobiano que las mieles crudas, lo que podría deberse a que este microorganismo fue más sensible a los compuestos fenólicos extraídos, mientras que el resto de los microorganismos fueron más sensibles a los compuestos no fenólicos que están presentes en la miel cruda. Estudios anteriores demostraron la actividad antimicrobiana de los ácidos fenólicos (p-cumárico, ferúlico y siríngico) contra *L. monocytogenes* (Miyague et al., 2015). Malheiro et al. (2018), también demostraron que el ácido cinámico y el aldehído cinámico y sus derivados inhiben significativamente el crecimiento de bacterias como *E. coli* y *S. aureus*.

Tabla 16. Concentración mínima de inhibición (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) de las mieles crudas (RH), de los extractos metanólicos de miel (ME) y de la miel después de la digestión in vitro (DH), expresadas como % de miel, extracto o fracción digestiva y, entre paréntesis, la correspondiente concentración de miel (g/100 ml). Los triplicados mostraron idéntica MIC o MBC para cada muestra. Los valores diferentes de MIC o MBC indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras con la misma extracción para cada microorganismo

		<i>E. coli</i>														
		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15
RH	MIC	18.75 (18.75)	37.5 (37.5)	18.75 (18.75)	9.38 (9.38)	18.75 (18.75)	9.38 (9.38)	18.75 (18.75)	18.75 (18.75)	9.38 (9.38)	18.75 (18.75)	9.38 (9.38)	9.38 (9.38)	9.38 (9.38)	9.38 (9.38)	18.75 (18.75)
	MBC	18.75 (18.75)	>37.5 (>37.5)	18.75 (18.75)	9.38 (9.38)	18.75 (18.75)	9.38 (9.38)	18.75 (18.75)	18.75 (18.75)	18.75 (18.75)	37.5 (37.5)	18.75 (18.75)	9.38 (9.38)	9.38 (9.38)	9.38 (9.38)	18.75 (18.75)
ME	MIC	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	15 (75)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)
	MBC	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	15 (75)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)
DH	MIC	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)
	MBC	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)
		<i>S. aureus</i>														
		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15
RH	MIC	9.38 (9.38)	>37.5 (>37.5)	9.38 (9.38)	4.69 (4.69)	9.38 (9.38)	4.69 (4.69)	9.38 (9.38)	9.38 (9.38)	9.38 (9.38)	9.38 (9.38)	4.69 (4.69)	9.38 (9.38)	4.69 (4.69)	4.69 (4.69)	9.38 (9.38)
	MBC	9.38 (9.38)	>37.5 (>37.5)	9.38 (9.38)	4.69 (4.69)	9.38 (9.38)	4.69 (4.69)	9.38 (9.38)	9.38 (9.38)	9.38 (9.38)	9.38 (9.38)	4.69 (4.69)	9.38 (9.38)	4.69 (4.69)	4.69 (4.69)	9.38 (9.38)
ME	MIC	15 (75)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	15 (75)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)
	MBC	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)
DH	MIC	40 (3.13)	<5 (<0.39)	<5 (<0.39)	<5 (<0.39)	<5 (<0.39)	12.5 (0.98)	25 (1.95)	25 (1.95)	25 (1.95)	<5 (<0.39)	25 (1.95)	25 (1.95)	25 (1.95)	<5 (<0.39)	25 (1.95)
	MBC	>90 (>7)	25 (1.95)	25 (1.95)	25 (1.95)	25 (1.95)	25 (1.95)	40 (3.13)	>90 (7)	25 (1.95)	25 (1.95)	25 (1.95)	25 (1.95)	75 (5.85)	25 (1.95)	90 (7)

		<i>L. monocytogenes</i>														
		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15
RH	MIC	18.75 (18.75)	37.5 (37.5)	18.75 (18.75)												
	MBC	37.5 (37.5)	>37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	18.75 (18.75)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	18.75 (18.75)	18.75 (18.75)	37.5 (37.5)	18.75 (18.75)	37.5 (37.5)	18.75 (18.75)	18.75 (18.75)
ME	MIC	5 (25)	<1 (<5)	<1 (<5)	5 (25)	<1 (<5)	5 (25)	5 (25)	<1 (<5)	5 (25)	<1 (<5)	5 (25)	5 (25)	<1 (<5)	<1 (<5)	5 (25)
	MBC	15 (75)	<1 (<1)	<1 (<1)	15 (75)	<1 (<1)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	5 (25)	15 (75)	15 (75)	5 (25)	<1 (<1)	15 (75)
DH	MIC	40 (3.13)	40 (3.13)	40 (3.13)	40 (3.13)	40 (3.13)	40 (3.13)	40 (3.13)	40 (3.13)	40 (3.13)	40 (3.13)	>90 (>7)	>90 (>7)	40 (3.13)	40 (3.13)	40 (3.13)
	MBC	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	40 (3.13)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)
		<i>St. mutans</i>														
		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15
RH	MIC	18.75 (18.75)	37.5 (37.5)	18.75 (18.75)												
	MBC	18.75 (18.75)	37.5 (37.5)	18.75 (18.75)	18.75 (18.75)	37.5 (37.5)	18.75 (18.75)	18.75 (18.75)	18.75 (18.75)	18.75 (18.75)	18.75 (18.75)	37.5 (37.5)	18.75 (18.75)	18.75 (18.75)	18.75 (18.75)	18.75 (18.75)
ME	MIC	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	5 (25)	15 (75)	15 (75)	15 (75)
	MBC	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)
DH	MIC	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)
	MBC	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)

		<i>C. albicans</i>														
		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15
RH	MIC	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)
	MBC	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	45 (>45)	>45 (>45)
ME	MIC	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)
	MBC	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)
DH	MIC	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)
	MBC	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)
		<i>Ps. aeruginosa</i>														
		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15
RH	MIC	9.38 (9.38)	37.5 (37.5)	9.38 (9.38)												
	MBC	9.38 (9.38)	37.5 (37.5)	9.38 (9.38)												
ME	MIC	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)
	MBC	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)
DH	MIC	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)
	MBC	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)

En cuanto a la fracción soluble obtenida tras la digestión *in vitro*, observamos que sólo presentaba actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* y *L. monocytogenes*, mostrando MICs entre <5 y 40% (0,39-3,13 mg/100 ml) para *S. aureus* y entre 40 y >90% (3,13->7 mg/100 ml) para *L. monocytogenes*. No se pudieron evaluar concentraciones más altas de estos extractos porque en la fracción soluble obtenida tras la digestión, la concentración de miel ya era del 7,82%. Las MIC obtenidas contra estos dos microorganismos fueron inferiores a las obtenidas para las mieles crudas correspondientes, lo que podría deberse en parte a las enzimas añadidas durante la digestión *in vitro*, porque el blanco de digestión también mostró cierta inhibición para ambos microorganismos (MIC = 60% fracción de digestión). Sin embargo, las muestras mostraron una MIC más baja (y, por tanto, una mayor actividad antimicrobiana) que el blanco, por lo que las fracciones solubles obtenidas tras la digestión *in vitro* de las mieles mostraron una clara actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* y *L. monocytogenes*. Mannina et al. (2016) informaron de la ausencia de actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* tras la digestión gástrica de la miel de Manuka y de una baja reducción de la actividad antiestafilocócica tras la digestión gastroduodenal en comparación con la muestra no digerida. La actividad antimicrobiana de la fracción obtenida tras la digestión también se estudió en otros alimentos obteniendo resultados diferentes. En el extracto acuoso de pulpa de café, la actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus* tras la digestión *in vitro* disminuyó, lo que sugiere que los compuestos bioactivos podrían degradarse durante la digestión *in vitro*, existiendo también una alteración estructural llevada a cabo tanto por las enzimas digestivas como por el bajo pH del sistema digestivo. Khochapong et al. (2021) y López-Nicolas et al. (2014) también obtuvieron una disminución de aproximadamente el 10% de la actividad antibacteriana contra *E. coli* y *S. aureus* con los zumos de frutas tras la digestión *in vitro*. Sin embargo, Piscopo et al. (2020) obtuvieron un aumento de la actividad antimicrobiana de Feijoa (*Feijoa sellowiana*) tras la digestión gastrointestinal *in vitro*.

4.5. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Para estudiar la influencia de los procedimientos químicos y de digestión en los resultados, se analizaron los fenoles, los flavonoides y las actividades antioxidante y antiinflamatoria mediante PCA. Las dos primeras componentes describieron el 78,9% de la varianza (Figura 47). El PC1 se define principalmente por los fenoles totales y la actividad antioxidante frente a ROO[•], mientras que el PC2 estaba definido por los flavonoides. Las muestras con puntuaciones similares se situaron muy juntas. El PCA dividió las muestras en tres grupos. Las RH estaban en el centro (grupo I), con un contenido de flavonoides más alto que las DH y las ME. Las ME se encontraban en el lado izquierdo de la Figura 47 (grupo II), mostrando una mayor actividad antiinflamatoria y un menor contenido de fenoles y actividades antioxidantes. Las DH se encontraban en el lado derecho (grupo III) y mostraban un mayor contenido de fenoles totales y una mayor capacidad antioxidante. El hecho de que ME y DH estuvieran en posiciones opuestas es lógico, porque los fenoles totales comprenden en

realidad todos los compuestos reductores, algunos de los cuales no se extraen con metanol. Por el contrario, algunos procedimientos de hidrólisis que se incluyen en la digestión aumentan las sustancias reductoras que se cuantifican como fenoles totales. Como se esperaba, hubo correlaciones entre los compuestos reductores evaluados por Folin-Ciocalteu y las actividades antioxidantes. Sin embargo, la actividad antiinflamatoria no se relacionó con ninguno de estos compuestos.

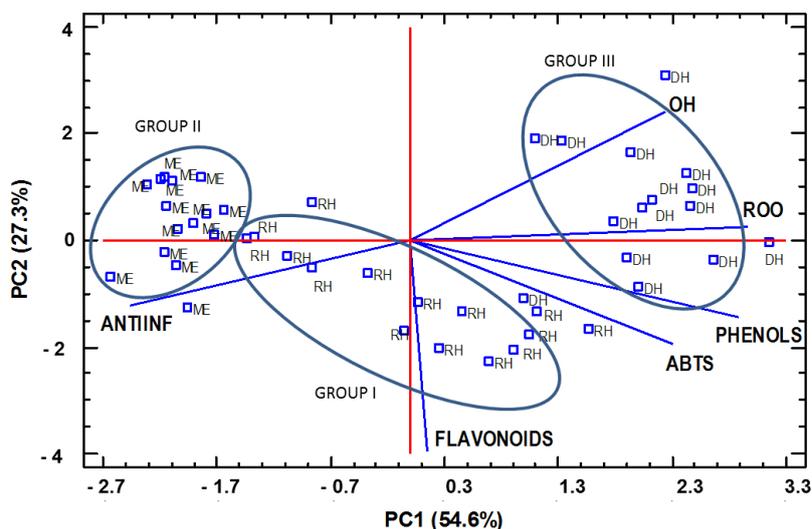


Figura 45. Análisis de componentes principales de las 15 mieles RH, ME y DH en función de fenoles totales, flavonoides totales, actividad antioxidante y actividad antiinflamatoria

5. CONCLUSIONES

1. Las mieles de brezo mostraron los contenidos más altos de compuestos bioactivos y actividades potencialmente funcionales más elevadas que otras mieles. Por el contrario, las muestras de viborera han presentado las cantidades más bajas de compuestos bioactivos y actividades potencialmente funcionales en relación con las mieles crudas, los extractos metanólicos y las muestras sometidas a digestión.
2. En general, los extractos metanólicos de las mieles exhibieron una menor cantidad de fenoles y flavonoides totales, una menor actividad antioxidante y antimicrobiana (para todos los microorganismos estudiados excepto *L. monocytogenes*) y una mayor actividad antiinflamatoria que las mieles crudas. Sin embargo, la fracción soluble tras la digestión *in vitro* mostró una mayor cantidad total de fenoles y actividad antioxidante y una menor actividad antiinflamatoria. Estos resultados sugieren que algunos compuestos bioactivos de la miel son resistentes a la acción de las enzimas digestivas o podrían liberarse durante la digestión *in vitro*, aumentando las propiedades antioxidantes y antimicrobianas, mientras que otros compuestos, como los flavonoides, podrían degradarse, de modo que otras propiedades biológicas, como la actividad antiinflamatoria, disminuirían.

Este estudio es el primero en el que se simuló la fase oral de la digestión de la miel. Las diferencias observadas entre nuestro estudio y las investigaciones anteriores podrían poner de manifiesto la necesidad de incluir la fase oral en futuros estudios de digestión *in vitro*.

Nuestro trabajo confirma que, tras la digestión gastrointestinal *in vitro*, la miel sigue manteniendo compuestos con actividad antioxidante y antimicrobiana contra *L. monocytogenes* y *S. aureus*.

Los extractos metanólicos obtenidos de la miel pueden ser potencialmente útiles en los campos de la cosmética y la farmacia por su actividad antiinflamatoria.

Este estudio ha sido publicado: Alevia M., Rasines S., Cantero L., Sancho M.T., Fernández-Muiño M.A., Osés S.M. (2021). Chemical extraction and gastrointestinal digestion of honey: Influence on its antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities. *Foods*, 10, 1412. <https://doi.org/10.3390/foods10061412> (ANEXO I).

V. CONCLUSIONES GENERALES

V. CONCLUSIONES GENERALES

Respondiendo a los objetivos previamente planteados, se puede concluir que:

1. El análisis melisopalínológico de las 30 muestras analizadas de Castilla y León dio como resultado que siete mieles eran de milflores, cinco de viborera (Boraginaceae tipo *Echium* sp.), cinco de brezo (Ericaceae tipo *Erica* sp. y tipo *Calluna vulgaris*), tres de trébol (Leguminosae tipo *Trifolium* sp), tres de aliaga (Leguminosae tipo *Genista scorpius*), dos de mielada, dos de bosque, una de cuernecillo (Leguminosae tipo *Lotus* sp.), una de zarzamora (Rosaceae tipo *Rubus* sp.) y una de castaño (Fagaceae tipo *Castanea sativa* Miller).
2. La cromatografía de gases resultó ser una técnica adecuada para la determinación del perfil en compuestos volátiles y semivolátiles, obteniendo de cada miel una huella aromática. Con el conjunto de las 30 huellas aromáticas se elaboró un perfil aromático que consta de 231 sustancias volátiles y semivolátiles, encontrando 76 compuestos alifáticos, 69 derivados del benceno, 24 compuestos derivados del calentamiento y envejecimiento, 17 norisoprenoides, 12 compuestos heterocíclicos, 12 terpenoides, 5 flavonoides, 4 compuestos policíclicos y 12 compuestos desconocidos.
3. De los 10 orígenes botánicos del estudio, se consiguió una separación en el análisis de componentes principales para las mieles de bosque, brezo, cuernecillo y castaño, mientras que en seis de ellos (mielada, viborera, aliaga, milflores, trebol y zarzamora) las mieles no pudieron ser separadas por los compuestos aromáticos. El bajo número de muestras de cada origen botánico dificulta en gran medida la selección de compuestos marcadores. Sin embargo, a la luz de los datos obtenidos se propusieron posibles marcadores para los diferentes orígenes botánicos, siendo los compuestos seleccionados en las mieles de mielada el 2,3-butanodiol (isómero 1), en las mieles de bosque el 1- etoxibutano y la 3-hidroxi-2-butanona, en las mieles de brezo el 4-vinil-2-metoxifenol, el fenilmetanol, el 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol (hotrienol), el desconocido de masas 105, 147, 120, 119, 91, 204, 133 y el desconocido de masas 107, 136, 77, en las mieles de cuernecillo el megastigmatrienona (isómero 1), el ácido 4-hidroxifenilacético y el 3-oxo- α -ionol y en mieles de castaño el 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6- metil-4-H-piran-4-ona (isómero 2) y el desconocido de masas 133, 162, 118, 89, 77, 63.
4. Se observó que la naringenina fue el compuesto encontrado a mayor concentración en gran parte de las muestras y que el ácido gálico fue el detectado en menor número de muestras y en menor cantidad. Los compuestos fenólicos en global presentaron los valores más bajos en las muestras de viborera y los más elevados en las muestras de

brezo. La naringenina fue el compuesto fenólico predominante en mieles de brezo y bosque, mientras que el ácido cafeico lo fue en las mieles de aliaga. El ácido clorogénico, junto con el cafeico fueron los ácidos fenólicos minoritarios en las mieles de brezo.

5. En las mieles de brezo se obtuvieron los valores más altos de fenoles totales y flavonoides totales, así como una mayor actividad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana, respecto a las mieles de otros orígenes botánicos. Las muestras de viborera, por lo contrario, mostraron las cantidades más bajas de estos compuestos y menores actividades. Estos datos son concordantes con los resultados obtenidos en relación al perfil fenólico de las mieles mediante HPLC.
6. Comparando la extracción química y fisiológica (incluyendo la fase oral) de las 15 muestras seleccionadas, en general, los extractos metanólicos de las mieles mostraron una menor cantidad de fenoles y flavonoides totales, una menor actividad antioxidante y antimicrobiana (para todos los microorganismos estudiados excepto *L. monocytogenes*) y una mayor actividad antiinflamatoria que las mieles crudas. La fracción soluble tras la digestión *in vitro*, sin embargo, presentó una mayor cantidad de fenoles totales y actividad antioxidante, así como una mayor actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* y *L. monocytogenes* y una menor actividad antiinflamatoria. Estos resultados parecen indicar que algunos compuestos bioactivos de la miel son resistentes a la acción de las enzimas digestivas o podrían liberarse durante la digestión *in vitro*, subrayando los posibles efectos antioxidantes y antimicrobianos de la miel en el organismo tras el proceso de digestión, mientras que otros compuestos, como los flavonoides, parecen degradarse, de modo que otras propiedades biológicas, como la actividad antiinflamatoria, podrían disminuir. Concluyendo que los extractos metanólicos obtenidos de la miel debido a su actividad antiinflamatoria pueden ser útiles en los campos de la cosmética y la farmacia.

VI. BIBLIOGRAFIA

VI. BIBLIOGRAFIA

Abdellah, F., Abderrahim, L.A. (2014). Honey for gastrointestinal disorders. In L. Boukraâ (Ed.), *Honey in traditional and modern medicine* (pp. 159–186). Boca Raton, FL: CRC Press. ISBN 9781138199279.

Acquarone, C., Buera, P., Elizalde, B. (2007). Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys, *Food Chemistry*, 101 (2), 695–703. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.058>.

Adam, C. J., Boulton, C. H., Deadman, B. J., Farr, J. M., Grainger, M. N. C., Manley Harrys, M., Snow, M. J. (2008). Isolation by HPLC and characterization of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydrate Research*, 343, 651–659. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.12.011>

Adrian, J. (2020). Efecto de la digestión in vitro sobre los compuestos fenólicos y actividad antioxidante de la miel. Trabajo fin de grado. Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos. Universidad de Burgos.

Agronews. (2021). Disponible en: <https://www.agronewscastillayleon.com/rumania-se-consolidado-como-el-principal-pais-abastecedor-de-miel-de-la-industria-espanola-en-2021-con>. Último acceso 30 /01/2022.

Ahmed, A. Y., Wabaidur, S. M., Siddiqui, M. R., Alothman, Z. A., Obeid, M. S., Khan, M. R., Al-tamrah, S. A. (2016). Simultaneous determination of twenty-five polyphenols in multifloral and cactus honeys using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *European Food Research and Technology*, 242(6), 943–952. <https://doi.org/10.1007/s10337-017-3405-0>

Ahmed, M., Djebli, N., Hammoudi, S., Aissat, S., Akila, B., Hemida, H. (2012). Additive potential of ginger starch on antifungal potency of ginger starch on antifungal potency of honey against *Candida albicans*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, 253–255. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60018-5](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60018-5)

Ajibola, A., Chamunorwa, J.P., Erlwanger, K.H. (2012). Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. *Nutrition and Metabolism (Lond)* 9, 61. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-9-61>

Al Somal, N., Coley, K. E., Molan, P. C., Hancock, B. M. (1994). Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of manuka honey. *The Royal Society of Medicine*, 87, 9–12.

Ali, A. T., Chowdhury, M. N., Al Humayyd, M. S. (1991). Inhibitory effect of natural honey on *Helicobacter pylori*. *Tropical Gastroenterology*, 12, 139–143.

Alissandrakis, E., Daferera, D., Tarantilis, P.A., Polissiou, M., Harizanis, P.C. (2003). Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. *Food Chemistry*, 82, 575–582. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00013-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00013-X)

Alissandrakis, E., Tarantilis, P.A., Pappas, C., Harizanis, P. C., Polissiou, M. (2009). Ultrasound-assisted extraction gas chromatography-mass spectrometry analysis of volatile compounds in unifloral thyme honey from Greece. *European Food Research and Technology* 229(3), 365–373. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1046-8>

Alissandrakis, E., Tarantilis, P.A., Pappas, C., Harizanis, P. C., Polissiou, M. (2011). Investigation of organic extractives from unifloral chestnut (*Castanea sativa* L.) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill.) honeys and flowers to identification of botanical marker compounds. *LWT-Food Science and Technology*, 44 (4), 1042–1051 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.10.002>

- Aljadi, A. M., Yusoff, K. M. (2003). Isolation and identification of phenolic acids in Malaysian honey with antibacterial properties. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 33, 229-236.
- Al-Khalidi, A., Jawad, F. H., Tawfiq, N. H. (1980). Effects of bees honey, zahdi dates and its syrup on blood glucose and serum insulin of diabetics. *Nutrition reports international*, 21(5), 631-643.
- Allen, K. L., Molan, P. C., Reid, G. M. (1991). A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 43(12), 817-822. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1991.tb03186.x>
- Almaas, H., Cases, A., Devold, T. G., Holm, H., Langsrud, T., Aabakken, L., ... Vegarud, G.E. (2006). In vitro digestion of bovine and caprine milk by human gastric and duodenal enzymes. *International Dairy Journal*, 16, 961-966. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.029>
- Almeida da Silva, I.A., Sarmiento da Silva, T.M., Camara, C.A., Queiroz, N., Magnani, M., Santos de Novais, J., Bastos Soledade, L.E., de Oliveira Lima, E., de Souza, A.L., Gouveia de Souza, A. (2013). Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chemistry* 141, 3552–3558. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1823671>
- Alminger, M., Aura, A. M., Bohn, T., Dufour, C., El, S. N., Gomes, A., Karakaya, S., Martínez-Cuesta, M. C., McDougall, G. J., Requena, T., Santos, C. N. (2014.) In vitro models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 13:413–436. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12081>
- Alqarni, A.S., Ayman, A.O., Awad, A.M. (2016). Physicochemical characteristics, total phenols, and pigments of national and international honeys in Saudi Arabia. *Arabian Journal of Chemistry*, 9 (1), 114-120. <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.arabjc.2012.11.013>
- 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, 2490-2499. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.021>
- Alvarez-Suarez, J.M., 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). <https://doi.org/10.2174/157341109789077768>
- Al-Waili, N. S., Al-Ghamdi, A., Ansari, M., Al-Attal, Y., Al-Mubarak, A., Salom, K. (2013). Differences in composition of honey samples and their impact on the antimicrobial activities against drug multiresistant bacteria and pathogenic fungi. *Archives of Medical Research*, 44, 307–316. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.04.009>
- Al-Waili, N. S., Boni, N. S. (2003). Natural honey lowers plasma prostaglandin concentrations in normal individuals. *Journal of Medical Food*, 6, 129-133. <https://doi.org/10.1089/109662003322233530>
- Ananias, K. R., de Melo, A.A., de Moura, C.J. (2013). Analysis of moisture content, acidity and contamination by yeast and molds in *Apis mellifera* L. honey from central Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 44, 3, 679-683. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822013000300003>
- Anastasiou, I.A., Eleftheriadou, I., Tentolouris, A., Samakidou, G., Papanas, N., Tentolouris, N. (2021). Therapeutic Properties of Honey for the Management of Wounds, Is There a Role in the Armamentarium of Diabetic Foot Ulcer Treatment? Results From In vitro and In vivo Studies. *International Journal of Lower Extremity Wounds*, 20(4), 291-299. <https://doi.org/10.1177/15347346211026819>
- Andrade, J., Denadai, M., de Oliveira, C., Nunes, M. and Narain, N. (2017). Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Research International*, 101, 129-138.

- Andrade, P., Ferreres, F., Amaral, M.T. (1997). Analysis of Honey Phenolic Acids by HPLC, Its Application to Honey Botanical Characterization, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 20, 14, 2281-2288. <https://doi.org/10.1080/10826079708006563>
- Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey, *Food Chemistry*, 63, (4), 549-562. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00057-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00057-0)
- Arcot, J., Brand-Miller, J. (2005). A preliminary assessment of the glycemic index of honey. *Rural Industries Research and Development Corporation, Australian Government. Publication N° 05/027*, 28.
- Ávila, S., Beux, M. R., Ribani, R. H., Zambiasi, R. C. (2018). Stingless bee honey: Quality parameters, bioactive compounds, health-promotion properties and modification detection strategies. *Trends in Food Science and Technology*, 81(March), 37-50. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.002>
- Bahrani, A.M., Kakekhani, S., Hamounnavard, S., Doosti, A., Asbchin, S.A. (2011). Compare the therapeutic effect of honey on cutaneous leishmaniasis in the laboratory and human by Glucantim. *Journal of Veterinary Medicine*, 5, 43-48.
- Ball, D. W. (2007). The Chemical Composition of Honey. *Journal of Chemical Education*, 84(10), 1643. <https://doi.org/10.1021/ed084p1643>
- Baltrušaitytė, V., Venskutonis, P.R., Čeksterytė, V. (2007). Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry*, 2007, 101, 502-514. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.007>
- Barcarolo, R., Casson, P., (1997). Modified capillary CG/MS system enabling dynamic headspace sampling with on-line cryofocusing and cold on-column injection of liquid simples. *Journal of High Resolution Chromatography*, 20, 24-28. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240200105>
- Baroni, M.V., Nores, M.L., Díaz, M.P., Chiabrando, G.A., Fassano, J.P., Costa, C., Wunderlin, D.A. (2006). Determination of volatile organic compound patterns characteristic of five unifloral honey by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry coupled to chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 19, 7235-7241. <https://doi.org/10.1021/jf061080e>
- Basson, N.J., Grobler, S.R. (2008). Antimicrobial activity of two South African honeys produced from indigenous *Leucospermum cordifolium* and *Erica* species on selected micro-organisms. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 8, 41. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-8-41>
- Bastos, C., Alves, R. (2003). Compostos voláteis em méis florais. *Química Nova* 26, 90-96. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100016>
- Beales, K.A., Betteridge, K., Colegate, S.M., Edgar, J.A. (2004). Solid-phase extraction and LC-MS analysis of pyrrolizidine alkaloids in honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6664-6672.
- Becerril-Sánchez, A.L., Quintero-Salazar, B., Dublán-García, O., Escalona-Buendía, H.B. (2021). Phenolic compounds in honey and their relationship with antioxidant activity, botanical origin, and color. *Antioxidants*, 10, 1700. <https://doi.org/10.3390/antiox10111700>
- Behbahani, M. (2014) Anti-HIV-1 activity of eight monofloral Iranian honey types. *PLOS ONE*, 9, e108195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108195>
- Belitz, H., Grosch, W., Schieberle, P. (2009). *Food chemistry*. 4th ed. Berlin: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7>
- Benavente, D., Mrcp, C. D. Ch., Ferro, Ch. J. (2010). Principales componentes del sistema renina-angiotensina-aldosterona: historia, modulación farmacológica e impacto clínico, *Revista Médica Clínica Las Condes*, 21, 4, 516-529. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(10\)70567-8](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(10)70567-8)
- Benedetti, L., Pieralli, L. (1990). *Apicultura*. Ediciones Omega, S. A. Barcelona. ISBN:978-84-282-0895-6.

- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., Maffei, R. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.11.010>
- Bertoncelj, J., Polak, T., Kropf, U., Korošec, M., Golob, T. (2011). LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey, *Food Chemistry*, 127 (1), 296-302. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.003>
- Bilsel, Y., Bugra, D., Yamaner, S., Bulut, T., Cevikbas, U., Turkoglu, U. (2002). Could honey have a place in colitis therapy? Effects of honey, prednisolone, and disulfiram on inflammation, nitric oxide, and free radical formation. *Digestive Surgery* 19(4), 306-311. <https://doi.org/10.1159/000064580>
- Biluca, F.C., da Silva, B., Caon, T., Mohr, E.T.B., Vieira, G.N., Gonzaga, L.V., Vitali, L., Micke, G., Fett, R., Dalmarco, E.M., Costa, A.C.O. (2020.) Investigation of phenolic compounds, antioxidant, and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (Meliponinae). *Food Research International*, 129, 108756. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108756>
- BOE-Boletín Oficial del Estado. (2003). Real Decreto 1049/2003 de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel (B.O.E. n° 186 de 5 de agosto de 2003).
- BOE-Boletín Oficial Del Estado. (2020). Real Decreto 523/2020 de 19 de mayo, por el que se modifica el Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel (B.O.E. n° 173 de 22 de junio de 2020).
- Bogdanov, S. (1997). Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *LWT - Food Science and Technology*, 30, 748–753. <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0259>
- Bogdanov, S. (2017a). Honey Composition. *The Honey Book, Chapter 5. Bee Products Science*. Disponible en: <http://www.bee-hexagon.net/english/bee-products/downloads-honey-book>. Último acceso 22/01/2022
- Bogdanov, S. (2017b). Honey as nutrient and functional food. *The Honey Book, Chapter 8*. <https://www.bee-hexagon.net/english/bee-products/downloads-honey-book> Último acceso 22/01/2022.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., Gallmann, P. (2008). Honey for Nutrition and Health: A Review. *American Journal of the College of Nutrition*, 27, 677-689. <https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719745>
- Bogdanov, S., Ruoff, K., Oddo, L.P. (2004). Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: a review, *Apidologie*, 35 S4–S17. Inra/Dib-Agib/ EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/apido:2004047>
- Bohn, T., Blackwood, M., Francis, D., Tian, Q., Schwartz, S. J., Clinton, S. K. (2013). Bioavailability of phytochemical constituents from a novel soy fortified lycopene rich tomato juice developed for targeted cancer prevention trials. *Nutrition and Cancer*. 65, 919–929. <https://doi.org/10.1080/01635581.2011.630156>
- Bohn, T., Carriere, F., Day, L., Deglaire, A., Egger, L., Freitas, D., Golding, M., Le Feunteun, S., Macierzanka, A., Menard, O., Miralles, B., Moscovici, A., Portmann, R., Recio, I., Rémond, D., Santé-Lhoutelier, V., Wooster, T.J., Lesmes, U., Mackie, A.R., Dupont, D. (2018). Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58, 13, 2239-2261, <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1315362>
- Boisen, S., Eggum, B. O. (1991). Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition Research Reviews*, 4, 141–162. <https://doi.org/10.1079/NRR19910012>.
- Boukraâ, L. (2014) Healing properties of honey. In L. Boukraâ (Ed.), *Honey in traditional and modern medicine* (pp. 37–52) Boca Raton, FL: CRC Press. ISBN 9781138199279.

Bouseta A., Sheirman V., Collin S. (1996). Flavour and free amino acid composition of lavender and eucalyptus honeys. *Journal of food science*, 61, 683-687.

Braghini, F., Biluca, F. C., Ottequir, F., Gonzaga, L. V., Vitali, L., Micke, G. A., Costa, A. C. O., Fett, R. (2020). Effect of different storage conditions on physicochemical and bioactive characteristics of thermally processed stingless bee honeys. *LWT - Food Science and Technology*, 131. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109724>

Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., ... Recio, I. (2019) INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>

Brown, K.L. (2000). Control of bacterial spores. *British Medical Bulletin* 56(1), 158-171. <https://doi.org/10.1258/0007142001902860>

Brudzynski, K. (2006). Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Canadian Journal of Microbiology*, 52, 1228–1237. <https://doi.org/10.1139/w06-086>

Bucekova, M., Sojka, M., Valachova, I., Martinotti, S., Ranzato, E., Szep, Z., Majtán, V., Klaudivy, J., Majtan, J. (2017). El péptido antibacteriano derivado de abejas, defensina-1, promueve la reepitelización de heridas in vitro e in vivo. *Scientific reports*, 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07494-0>

Can, Z., Yildiz, O., Sahin, H., Akyuz E., Turumtay, Silici, S., Kolayli, S. (2015). An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles, *Food Chemistry*, 180, 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.024>

Candiracci, M., Piatti, E., Dominguez-Barragan, M., Garcia-Antras, D., Morgado, B., Ruano, D., ... Castano, A. (2012). Anti-inflammatory activity of a honey flavonoid extract on lipopolysaccharide-activated N13 microglial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 12304–12311. <https://doi.org/10.1021/jf302468h>

Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., Frigola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Food Science and Food Safety*, 13, 155–171. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12049>

Carrillo, C., Rey, R., Hendrickx, M., Cavia, M.M., Alonso-Torre, S. (2017a). Antioxidant Capacity of Beetroot: Traditional vs Novel Approaches. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72(3), 266-273. <https://doi.org/10.1007/s11130-017-0617-2>

Carrillo, C., Barrio, Á., Cavia, M.M., Alonso-Torre, S.R. (2017b). Global antioxidant response of meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 2358–2365. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8047>

Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina legal de Costa Rica*, 36 (1), 91-100.

Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C., de Torres, C., Pérez-Coello, M.S. (2010). Effect of geographical origin on the chemical and sensory characteristics of chestnut honeys. *Food Research International*, 43, 2335–2340. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.007>

Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C., González-Viñas, M. A., De La Fuente, E., Pérez-Coello, M.S. (2008). Influence of storage conditions on chemical composition and sensory properties of citrus honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(6), 1999-2006. <https://doi.org/10.1021/jf072227k>

Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C., González-Viñas, M.A., Pérez-Coello, M.S. (2009). Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. *Food Chemistry*, 112, 1022-30. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.036>

- Castro-Vázquez, L., Pérez-Coello, M.S., Cabezudo, M.D. (2003). Analysis of volatile compounds of rosemary honey. Comparison of different extraction techniques. *Chromatographia* 57, 227–233 <https://doi.org/10.1007/BF02491721>
- Cavia, M.M. (2002). Estudio del envejecimiento de mieles de Burgos y Galicia: influencia de la granulación inducida [Estudios de envejecimiento de mieles de Burgos y Galicia: Influencia de la granulación inducida]. Tesis doctoral inédita. Burgos Universidad de Burgos.
- Cavia, M.M., Fernández-Muiño, M.A., Alonso-Torre, S.R., Huidobro, J.F., Sancho, M.T. (2007) Evolution of acidity of honeys from continental climates: influence of induced granulation. *Food Chemistry*, 100(4), 1728-1731. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.019>
- Chen, L., Mehta, A., Berenbaum, M., Zangerl, A.R., Engeseth, J. (2000). Honeys from Different Floral Sources as Inhibitors of Enzymatic Browning in Fruit and Vegetable Homogenates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (10), 4997-5000. <https://doi.org/10.1021/jf000373j>
- Cienciosi, D., Forbes-Hernández, T.Y., Afrin, S., Gasparrini, M., Quiles, J.L., Gil, E., Bompadre, S., Simal-Gandara, J., Battino, M., Giampieri, F. (2020). The Influence of in vitro gastrointestinal digestion on the anticancer activity of manuka honey. *Antioxidants*, 9 (1), 64. <https://doi.org/10.3390/antiox9010064>
- Ciemniak, A., Witczak, A., Mocek, K. (2013). Assessment of honey contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Environmental Science and Health: Part B*, 48, 993–998. <https://doi.org/10.1080/03601234.2013.816609>
- Cimpoi, C., Hosu, A., Miclaus, V., Puscas, A. (2013). Determination of the floral origin of some Romanian honeys on the basis of physical and biochemical properties. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 100, 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.04.008>
- Clara, E., Quijano, C. (2004) Una visión acerca del aroma. *Química de unidades. Una visión acerca del aroma. Facultad de Ciencias. Química en Uniandes*. 1: 8-21.
- Coles, L.T., Moughan, P. J., Darragh, A. J. (2005). In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124 Pa, 421–444. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.021>
- Combarros, P., Estevinho, L.M., Díaz, L.G., Castro, J.M., Tomás-Barberán, F.A., Tornadijo, M.E., Fresno-Baro, J.M. (2019) Bioactive Components and Antioxidant and Antibacterial Activities of Different Varieties of Honey: A Screening Prior to Clinical Application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(2), 688-698. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.02110.1021/acs.jafc.8b05436>
- Cometto, P.M., Faye, P-F., Di Paola, R.D., Rubio, M.A., Aldao, M.A. (2003). Comparison of free amino acids profile in honey from three Argentinian regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 5079-87. <https://doi.org/10.1021/jf021081g>
- Comisión europea. (2019). Report from the commission to the European parliament and the council on the implementation of apiculture programmes. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX:52019DC0635>. Último acceso: 14/07/2022
- Comisión europea. (2021). Honey market overview (Spring 2021). *Agriculture and Rural Development*. Disponible en: https://ec.europa.eu/info/sites/default/files/food-farming-fisheries/animals_and_animal_products/documents/market-presentation-honey-spring2021_en.pdf. Último acceso: 24/01/2022.
- Comisión Europea. (2022). Nutrition and health claims. Disponible en: https://ec.europa.eu/food/safety/labelling_nutrition/claims/register/public/?event=search.

- Costa, E. D. A., Henrique, P., Sousa, M. D., Camurça, A., Siqueira, P., Altina, E., ... Gomes, D. S. (2019). Fruit pastes with organic honey texturized with gellan gum: Bioaccessibility of antioxidant activity and sensory analysis fruit pastes with gellan and organic honey. *Food Science and Technology*, 39(3), 667–676. <https://doi.org/10.1590/fst.05518>
- Cuevas-Glory, L.F., Pino, J.A., Santiago, L.S., Sauri-Duch, E. (2007). A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 103, 1032–1043. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.064>
- Cushnie, T. P., Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>
- Da Silva, C. I., Aazza, S., Faleiro, M.L., Miguel, M.G., Neto, L. (2016). The antibacterial, anti-biofilm, anti-inflammatory and virulence inhibition properties of Portuguese honeys, *Journal of Apicultural Research*, 55, 4, 292-304, <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1243294>
- Daglia, M., Ferrari, D., Collina, S., Curti, V. (2013). Influence of in vitro simulated gastroduodenal digestion on methylglyoxal concentration of manuka (*Lectospermum scoparium*) honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(9), 2140–2145. <https://doi.org/10.1021/jf304299d>
- D'Arcy, R., Rintoul, G. B., Rowland, C. Y., Blackman, A. J. (1997). Composition of Australian Honey extractives. I. Norisoprenoids, monoterpenes, and other natural volatiles from Blue Gum (*Eucalyptus leucoxylon*) and Yellow Box (*Eucalyptus melliodora*) Honeys, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(5) 1834–1843. <https://doi.org/10.1021/jf960625>
- De la Fuente, E., Sanz, M.L., Martínez-Castro, I., Sanz, J., Ruiz-Matute, A.I. (2007). Volatile and carbohydrate composition of rare unifloral honeys from Spain. *Food Chemistry*, 105, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.039>
- De Lorenzo, C. (2002). *La miel de Madrid. Consejería de Economía e Innovación Tecnológica. Colección de investigación:5* ISBN: 84-451-2284-3.
- De Luis Villota, P. (1999). *Las abejas y la miel. ISBN-13:978-8448304287.*
- Dean J.R., Liu B., Price R. (1998). Extraction of magnolol from *magnolia officinalis* using supercritical fluid extraction and phytosol solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, 9 (5), 248–252. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(199809/10\)9:5<248:AID-PCA409>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(199809/10)9:5<248:AID-PCA409>3.0.CO;2-3)
- Degen, J., Vogel, M., Richter, D., Hellwig, M., Henle, T. (2013). Metabolic transit of dietary methylglyoxal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(43), 10253–10260. <https://doi.org/10.1021/jf304946p>
- Díaz-Moreno, A. C. (2009). *Influencia de las condiciones de almacenamiento sobre la calidad físico-química y biológica de la miel. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.*
- Dobrinás, S., Birghila, S., Coatu, V. (2008). Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey and propolis produced from various flowering trees and plants in Romania. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 71–77. <https://doi.org/10.1021/jf304946p> [10.1016/j.jfca.200707.003](https://doi.org/10.1016/j.jfca.200707.003)
- DOCE-Diario Oficial de las Comunidades Europeas. (2002). *Directiva 2001/110/EC del Consejo de 20 de diciembre de 2001 relativa a la miel, Bruselas, Bélgica.*
- DOCE-Diario Oficial de las Comunidades Europeas. (2014). *Directiva 2014/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de mayo de 2014 por la que se modifica la Directiva 2001/110/CE relativa a la miel, Bruselas, Bélgica.*
- DOUE-Diario Oficial de la Unión Europea. (2006). *Reglamento (UE) N° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. Diario oficial de la Unión Europea, L404:9-25.*
- DOUE-Diario Oficial de la Unión Europea. (2014). *Directiva 2014/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de mayo de 2014 por la que se modifica la Directiva 2001/110/CE relativa a la miel.*

Europea 2014/63/UE, trasposición a España en Real Decreto 1049/2003, modificado por el Real Decreto 473/2015).

Dupont, D., Alric, M., Blanquet-Diot, S., Bornhorst, G., Cueva, C., Deglaire, A., Van den Abbeele, P. (2019) Can dynamic in vitro digestion systems mimic the physiological reality? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(10), 1546–1562. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1421900>

Dziurka, M., Kubica, P., Kwiecień, I., Biesaga-Kościełniak, J., Ekiert, H., Abdelmohsen, S.A.M., Al-Harbi, F.F., El-Ansary, D.O., Elansary, H.O., Szopa, A. (2021). In Vitro cultures of some medicinal plant species (*Cistus × incanus*, *Verbena officinalis*, *Scutellaria lateriflora*, and *Scutellaria baicalensis*) as a rich potential source of Antioxidants—Evaluation by CUPRAC and QUENCHER-CUPRAC Assays. *Plants* 2021, 10, 454. <https://doi.org/10.3390/plants10030454>

EFSA- European Food Safety Authority. (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to: dairy products (ID 1140, 1141, 1191), raw or processed food products of animal origin, plus bread and panification products (ID 1193, 1194), herbal yeast plasmolysate (ID 1815, 1816), apple polyphenols (ID 2713), rye flour (ID 1266), tomato juice (ID 1202), whey protein and alphasalalbumin (ID 424, 430,432, 725, 1433), “brocco shoots”, “broccoli sprout powder” and “*Brassica oleracea* var. *italica*(broccoli)” (ID 1362, 1481, 2844, 2845), honey (ID 1159, 1160, 1318, 4678, 4679), and *Cucurbita pepo* L. (pumpkin) seeds and seed extracts (ID 2029, 2365) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 9 (6), 2243.

EFSA-European Food Safety Authority. (2010). Scientific opinion on the substantiation of health claims related to honey and “respiratory health through presence of antioxidant phytochemicals” (ID 1161), “the unique composition and ratio of effective substances adds energy to the human body” (ID 3188), and “it stimulates the whole metabolism and the immune system” (ID 3189) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 8 (2), 1484.

Egger, L., Ménard, O., Portmann, R. (2019). Quantitative characterization of digestion processes. In *Interdisciplinary approaches to food digestion* (pp. 159–184). Springer. International Publishing https://doi.org/10.1007/978-3-030-03901-1_8

El-Arab, A.M., Girgis, S.M., Hegazy, E.M., Abd El, A.B. (2006). Effect of dietary honey on intestinal microflora and toxicity of mycotoxins in mice. *BMC Complementary Medicine and Alternative Medicine*, 6 (6). <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-6>

Erejuwa, O.O., Sulaiman, S.A., Ab Wahab, M.S. (2012). Honey: A novel antioxidant. *Molecules*, 17, 4400–4423. <https://doi.org/10.3390/molecules17044400>

Erejuwa, O.O., Sulaiman, S.A., Ab Wahab, M.S., Sirajudeen, K.N.S., Salleh, M.S.M., Gurtu, S. (2011) Differential responses to blood pressure and oxidative stress in streptozotocin- induced diabetic Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats: Effects of antioxidant (Honey) treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 1888–1907. <https://doi.org/10.3390/ijms12031888>

Erguder, B. I., Kilicoglu, S. S., Namuslu, M., Kilicoglu, B., Devrim, E., Kismet, K., Durak, I. (2008) Honey prevents hepatic damage induced by obstruction of the common bile duct. *World Journal of Gastroenterology*, 14(23), 3729-3732. <https://doi.org/10.3748%2Fwjg.14.3729>

Erk, T., Renouf, M., Williamson, G., Melcher, R., Steiling, H., Richling, E. (2014). Absorption and isomerization of caffeoylquinic acids from different foods using ileostomist volunteers. *European Journal of Nutrition*, 53, 159–166. <https://doi.org/10.1007/s00394-013-0512-z>

Escriche, I., Kadar, M., Juan-Borrás, M., Domenech, E. (2014). Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment, *Food Chemistry*, 142, 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.033>

Escriche, I., Tanleque-Alberto, F., Visquert, M., Oroian, M. (2017). Physicochemical and rheological characterization of honey from Mozambique. *LWT-Food Science and Technology*, 86, 108-115. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.053>

- Falcão, S., Caveiro, E., Russo, P., Seijo, M.C., Martins, V., Vilas-Boas, M. (2017). *The volatile profile for discrimination of lavender and heather honey, using solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry*. Instituto Politécnico de Bragança. ISSN: 978-972-745-234-7. <http://hdl.handle.net/10198/16056>
- Falcão, S., Tomás, A., Vale, N., Gomes, P., Freire, C., Vilas-Boas, M. (2013) *Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese propolis*. *Industrial Crops and Products*, 49, 805-812.
- Fallico, B., Zappalà, M., Arena, E., Vercera, A. (2004) *Effects of conditioning on HFM content in unifloral honeys*. *Food Chemistry*, 85,305-313.
- Farooqui, T., Farooqui, A.A. (2014.) *Honey for cardiovascular diseases*. In L. Boukraâ (Ed.), *Honey in traditional and modern medicine* (pp. 187–216). Boca Raton, FL: CRC Press. ISBN 9781138199279.
- Fattori, S.B. (2004). *La miel. Propiedades, composición y análisis físico químico*. Ampimondia. Universidad de Buenos Aires, República Argentina Dirección Nacional de Derecho de Autor Expediente N° 359100.
- Felsner, M., Cano, C.B., Matos, J.R., de Almeida-Muradian, L.B., Bruns, R.E. (2004) *Optimization of thermogravimetric analysis of ash content in honey*. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 15, No. 6, 797-802. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532004000600002>.
- Fernández-Torres, R., Pérez-Bernal, J., Bello-López, M.A., Callejón-Mochón, M., Jiménez-Sánchez, J.C., Guiraúm-Pérez, A. (2005). *Contenido mineral y origen botánico de las mieles españolas*. *Talanta*, 65 (3), 686-691. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.cdr16-83.dfc>
- Ferreira, I. C. F. R., Aires, E., Barreira, J. C. M., Estevinho, L. M. (2009). *Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract*. *Food Chemistry*, 114, 1438–1443GJHE. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.028>
- Ferreres, F., Lopes, G., Gil-Izquierdo, A., Andrade, P.B., Sousa, C., Mouga, T., Valentão, P. (2012). *Phlorotannin extracts from fucales characterized by HPLC-DAD-ESI-MSn: Approaches to hyaluronidase inhibitory capacity and antioxidant properties*. *Marine Drugs*, 10 (12), 2766-2781. <https://doi.org/10.3390%2Fmd10122766>
- Fitzgerald, R.J., Murray, B.A. (2006). *Bioactive peptides and lactic fermentations*. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 118-125. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2006.00250.x>
- Fратиanni, F., Ombra, M.N., d’Acierno, A., Caputo, L., Amato, G., De Feo, V., Coppola, R., Nazzaro, F. (2021). *Polyphenols Content and In Vitro-α-Glycosidase Activity of Different Italian Monofloral Honeys, and Their Effect on Selected Pathogenic and Probiotic Bacteria*. *Microorganisms*, 9, 1694. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081694>
- García D.C., Zavaleta N.L.W. (2009). *Identificación química de compuestos fenólicos por cromatografía de HPLC con detector UV de extractos etanólicos de propóleos recolectados en la zona Córdoba-Orizaba*. Tesis doctoral. Facultad Ciencias Química.
- García Pérez, R. (2003). *Estudio palinológico y colorimétrico de mieles monoflorales de la región de Murcia*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Cartagena.
- Gasparrini, M., Afrin, S., Forbes-Hernández TY., Cianciosi, D., Reborado-Rodríguez, P., Amici, A., Battino, M., Giampieri, F. (2018). *Protective effects of manuka honey on LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Part 2: Control of oxidative stress induced damage, increase of antioxidant enzyme activities and attenuation of inflammation*. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 120, 578–87. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.001>
- Gheldof, N., Xiao-Hong, W., Engeseth, N.J. (2002). *Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5870-5877. <https://doi.org/10.1021/jf0256135>

- Goes, A. T. R., Jesse, C. R., Antunes, M. S., Lobo Ladd, F. V., Lobo Ladd, A., Luchese, C., Paroul, N., Boeira, S. P. (2017). Protective role of chrysin on 6-hydroxydopamine-induced neurodegeneration a mouse model of Parkinson's disease: Involvement of neuroinflammation and neurotrophins. *Chemico-Biological Interactions*, 279, 111-120. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.10.019>
- Gökmen, V., Serpen, A., Fogliano, V. (2009). Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the "QUENCHER" approach. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 278–288. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2009.03.010>
- Gómez Romero, M. (2010). *Desarrollo y evaluación de estrategias analíticas para la caracterización de compuestos bioactivos en alimentos funcionales*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.
- González-González, C. R., Tuohy, K. M., Jauregi, P. (2011.) Production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: Effects of calcium, pH, and peptides on the ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 21, 615-622. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.04.001>
- Guadalix, M., De Lorenzo, C., González, M^a. M., Navarro, T., Iglesias, M^a T., Pérez, R.A., Sanz, M.L., Martínez, I., Pueyo, E., Polo, M.C., Soria, A.C., Sanz, J. (2002). *La miel de Madrid*. Consejería de Economía e Innovación Tecnológica. ISBN:84-451-2284-3.
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends Biotechnol* 30(11), 591-600. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.08.001>
- Guo, Y., Mah, E., Bruno, R. S. (2014). Quercetin bioavailability is associated with inadequate plasma vitamin C status and greater plasma endotoxin in adults. *Nutrition*, 30, 1279–1286. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.03.032>
- Guyot C., Bouseta A., Scheirman V., Collins S. (1998). Floral origin markers of chestnut and lime tree honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 625-633. <https://doi.org/10.1021/jf970510l>
- Guyot C., Scheirman V., Collins S. (1999). Floral origin markers of heather honeys: *Calluna vulgaris* (L.) hull and *erica arborea*. *Food Chemistry*, 64, 3-11. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(98\)00122-8](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(98)00122-8)
- Guyot-Declerck, C., Chevance, F., Lermusieau, G., Collin S. (2000). Optimized extraction procedure for quantifying norisoprenoids in honey and honey food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5850-5855. <https://doi.org/10.1021/jf000504g>
- Habib, H.M., Al Meqbali, F.T., Kamal, H., Souka, U.D., Ibrahim, W.H. (2014). Bioactive components, antioxidant and DNA damage inhibitory activities of honeys from arid regions. *Food Chemistry*, 153, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.044>
- Hakim, D. A., W Tjahjaningsih, W., Sudarno. (2019). Antibacterial activity of honey in preserving high-pressure cooked milkfish stored at room temperature. *IOP Conference Series*. <http://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/236/1/012079>
- Halagarda, M., Groth, S., Popek, S., Rohn, S., Pedan, V. (2020) Antioxidant activity and phenolic profile of selected organic and conventional honeys from Poland. *Antioxidants*, 2020, 9 ,44. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532004000600002>
- Halawani, E.M. (2021). Potential effects of Saudi Shaoka (*Fagonia bruguieri*) honey against multi-drug-resistant bacteria and cancer cells in comparison to manuka honey, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28, (12),7379-7389. <https://doi.org/10.1016%2Fj.sjbs.2021.08.055>
- Hasjim, J., Lavau, C.G., Gidley, M.J., Gilbert R.G. (2010) In vivo and in vitro starch digestion: Are current in vitro techniques adequate? *Biomacromolecules* 11(12), 3600–3608. <https://doi.org/10.1021/bm101053y>

- Hoffman, A.S. (2002). Hidrogeles para aplicaciones biomédicas, *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 54, núm. 1, págs. 3 a 12.
- Horn, U., M. Helbig, M., Molzahn, D., Hentschel, E.J. (1996). The transfer of Ra into honey and the possible use of the honeybee (*Apis mellifera*) as a bioindicator in the radioactive Wismut uranium mining *Apidologie* 27 (1996) 211-217. <https://doi.org/10.1051/apido:19960403>.
- Horna, G., Silva, M., Vicente, W., Tamariz, J. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Médica Herediana*, 16 (1) 39-45.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Prior, R.L. (2002). Throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4437-4444. <https://doi.org/10.1021/jf0201529>
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.036>
- Hussein, S.Z., Yusoff, K.M., Makpol, S., Yusof, Y.A.M. (2013). Gelam honey attenuates carrageenan-induced rat paw inflammation via NF- κ B pathway. *PLOS ONE*, 8, e72365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072365>
- Ishisaka, A., Ikushiro, S., Takeuchi, M., Araki, Y., Juri, M., Yoshiki, Y., Kawai, Y., Niwa, T., Kitamoto, N., Sakaki, T., Ishikawa, H., Kato, Y. (2017) In vivo absorption and metabolism of leptosperin and methyl syringate, abundantly present in manuka honey. *Molecular Nutrition Food Research*, 61, 1700122. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700122>
- Isla, M. I., Craig, A., Ordoñez, R., Zampini, C., Sayago, J., Bedascarrasbure, E., Alvarez, A., Salomón, V., Maldonado, L. (2011) Physico chemical and bioactive properties of honeys from northwestern Argentina. *LWT-Food Science and Technology* 44(9), 1922-1930. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.04.003>
- Islam, M.N., Khalil, M.I., Islam, M.A., Gan, S.H. (2014). Toxic compounds in honey. *Journal of Applied Toxicology*, 34, 733-742. <https://doi.org/10.1002/jat.2952>
- Iwegbue, C.M.A., Tesi, G.O., Obi, G., Obi-Iyeke, G.E., Igbuku, U.A., Martincigh, B.S. (2016). Concentrations, health risks and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in nigerian honey. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 8, 28-42. <http://dx.doi.org/10.1007%2Fs13530-016-0259-z>
- Jara-Palacios, M.J., Ávila, F.J., Escudero-Gilete, M.L., Pajuelo, A.G., Heredia, F.J.; Hernanz, D., Terrab, A. (2019). Physicochemical properties, colour, chemical composition, and antioxidant activity of Spanish *Quercus* honeydew honeys. *European Food Research and Technology*, 245, 2017-2026. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-019-03316-x>
- Jasicka-Misiak, I., Poliwoda, A., Dereń, M., Kafarski, P. (2012). Phenolic compounds and abscisic acid as potential markers for the floral origin of two Polish unifloral honeys. *Food Chemistry*, 131 (4), 1149-1156. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.083>.
- Jenkins, D., Kendall, C., Augustin, L., Franceschi, S., Hamidi, M., Marchie, A., Jenkins, A., Axelsen, M. (2002). Glycemic index: overview of implications in health and disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76(1), 266S-273S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/76/1.266S>
- Jerković, I., Marijanović, Z. (2009). A short review of headspace extraction and ultrasonic solvent extraction for honey volatiles fingerprinting. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 1(2), 28-34. <https://hrcak.srce.hr/53251>.
- Jerković, I., Mastelic, J., Marijanovic, Z. (2011). Volatile compounds of *Asphodelus microcarpus* Salzm et Viv. honey obtained by HS-SPME, and USE analyzed by GC/MS. *Chemistry and Biodiversity* 8(4), 587-598. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201000205>

- Johnson, R.M. (2015). Honeybee toxicology. *Annual Review of Entomology*, 60, 415–434. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162005>.
- Juan, T., Conchello, P., Tello, M., Pérez, C., Herrera, A. (1992). Rotación específica y espectro glucídico de mieles de Zaragoza. *Alimentaria*, 232, 75-78.
- Junta de Castilla y León. (2021). La Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo rural incrementa un 70% el presupuesto de las ayudas para la mejora de la producción y comercialización de la miel. Disponible en: <https://comunicacion.jcyl.es/web/jcyl/Comunicacion/es/Plantilla100Detalle/1284721258325/NotaPrensa/1285063680400/Comunicacion>. Último acceso: 14/01/2022.
- Kao, T.K., Ou, Y.C., Raung, S.L., Lai, C.Y., Liao, S.L., Chen, C.J. (2010) Inhibition of nitric oxide production by quercetin in endotoxin/cytokine-stimulated microglia. *Life Sciences*, 86, 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.12.014>
- Karabagias, I. K., Badeka, A., Kontakos, S., Karabournioti, S., Kontominas, M.G. (2014.) Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Chemistry* 146, 548-557. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.105>.
- Karabagias, I. K., Karabournioti, S., Karabagias, V. K. y Badeka, A. V. (2020.) Palynological, physico-chemical and bioactivity parameters determination, of a less common Greek honeydew honey: “dryomelo”. *Food Control*, 109, 106940. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106940>
- Kasiotis, K., Anastasiadou, P., Papadopoulos, A., Machera, K. (2017). Chromatographic Analysis and antioxidant activity study. Revisiting Greek Propolis: *PLOS ONE*, 12(1), 0170077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170077>.
- Kassim, M., Achoui, Mustafa, M. R., Mohd, M. A., Yusoff, K. M. (2010). Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity. *Nutrition Research* 30(9), 650-659. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2010.08.008>
- Kassim, M., Mansor, M., Al-Abd, N., Yusoff, K.M. (2012) Gelam honey has a protective effect against lipopolysaccharide (LPS)-induced organ failure. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 6370–6381. <https://doi.org/10.3390/ijms13056370>.
- Kaulmann, A., Andre, C. M., Schneider, Y. J., Hoffmann, L., Bohn, T. (2015). Carotenoid and polyphenol bioaccessibility and cellular uptake from plum and cabbage varieties. *Food Chemistry*, 197 (Pt A):325–332. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.049>
- Kaur, M., Aggarwal, P., Kumar, V. (2021). Effect of chilli varieties and storage conditions on quality attributes of honey chilli sauce: A preservation study. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45 (9), e15734. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15734>
- Kędzierska-Matysek, M., Stryjecka, M., Teter, A., Skalecki, P., Domaradzki, P., Florek, M. (2021) Relationships between the content of phenolic compounds and the antioxidant activity of Polish honey varieties as a tool for botanical discrimination. *Molecules*, 26, 1810. <https://doi.org/10.3390/molecules26061810>
- Kempf, M., Beuerle, T., Buhringer, M., Denner, M., Trost, D., Von der Ohe, K., Bhavanam, V.B.R., Schreier, P. (2008). Pyrrolizidine alkaloids in honey: Risk analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52, 1193–1200. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800051>
- Kesić, A., Mazalovic, M., Crnkic, A., Catovic, B., Hadžidedic, S., Dragošević, G. (2009). The influence of L-ascorbic acid content on total antioxidant activity of beehoney. *European Journal of Scientific Research*, 32, 95-101.

- Khalil, M.I., Moniruzzaman, M., Boukraâ, L., Benhanifia, M., Islam, A., Islam, N., Sulaiman, S.A., Gan, S.H. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of algerian honey. *Molecules*, 17, 11199-11215. <https://doi.org/10.3390/molecules170911199>
- Khan, S. U., Anjum, S. I., Rahman, K., Ansari, M. J., Khan, W. U., Kamal, S., ..., Khan, H. U. (2017) Honey: Single food stuff comprises many drugs. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25 (2), 320-325. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.08.004>
- Khochapong, W., Ketnawa, S., Ogawa, Y., Punbusayakul, N. (2021). Effect of in vitro digestion on bioactive compounds, antioxidant and antimicrobial activities of coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extract. *Food Chemistry*, 348, 129094. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129094>
- Kilicoglu, B., Kismet, K., Koru, O., Oruc, M.T., Sorkum, K., Akkus, M.A. (2006). The scolicidal effects of honey. *Advances in Therapy*, 23, 1077-1083. <https://doi.org/10.1007/BF02850228>
- Koracevic, D., Koracevic, G., Djordjevic, V., Andrejevic, S., Cosic, V. (2001). Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 356-361. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.5.356>
- Krell, R. (1996). Value-added products from beekeeping. *FAO Agricultural Services Bulletin No. 124*. <http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e00.HTM>
- Kwakman, PH., Zaat, SA. (2012). Componentes antibacterianos de la miel. *IUBMB Life*, 64, 48-55. <https://doi.org/10.1002/iub.578>
- Leong, A.G., Herst, P.M., Harper, J.L. (2012). Indigenous New Zealand honeys exhibit multiple anti-inflammatory activities. *Innate Immunity*, 18, 459-466. <https://doi.org/10.1177/1753425911422263>
- León-Ruiz, V. (2013). Caracterización, determinación de vitaminas hidrosolubles y actividad antioxidante de mieles monoflorales de Castilla la Mancha. Tesis doctoral. Universidad de Alcalá. Madrid. .
- León-Ruiz, V., Vera, S., González-Porto, A.V., San Andrés, M.P. (2013). Analysis of water-soluble vitamins in honey by isocratic RP-HPLC. *Food Analytical Methods*, 6, 488-496 <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9477-4>
- Li, C., Yu, W., Wu, P., Chen, X. D. (2020). Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends in Food Science and Technology*, 96, 114-126. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.015>
- Lin, E., Calvano, S. E., Lowry, S. F. (2000). Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*, 127(2), 117-126. <https://doi.org/10.1067/msy.2000.101584>
- Lin, S., Molan, P., Cursons, R. (2011). The controlled in vitro susceptibility of gastrointestinal pathogens to the antibacterial effect of manuka honey. In *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 30, 569-574. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-1121-x>
- Liu, J., Hsu, F., Tsai, J., Chan, P., Liu, J. Y., Thomas, G. N., Tomlinson, B., Lo, M., Lin, J. (2003). Antihypertensive effects of tannins isolated from traditional chinese herbs as non-specific inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Life Science*, 73, 1543-1555. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(03\)00481-8](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00481-8)
- López Luengo, M^a T. (2002) Flavonoides. *Fitoterapia. Ámbito farmacéutico*, 21 (4), 108-113.
- López-Nicolás, R., González-Bermúdez, C.A., Ros-Berruazo, G., Frontela-Saseta, C. (2014). Influence of in vitro gastrointestinal digestion of fruit juices enriched with pine bark extract on intestinal microflora. *Food Chemistry*, 2014, 157, 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.126>
- Louveau, J., Maurizio, A., Vorwohl, G. (1978). International Commission for Bee Botany of IUBS. *Methods of Melissopalynology. Bee World* 59, 139-153. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1978.11097714>

- Lucas González, R. (2016). *Digestión de alimentos: Tendencias en los modelos de digestión in vitro*. *Revista Doctorado UMH*. ISSN: 2530-7320. Vol 2(2).
- Lucas González, R. (2017). *Digestión de alimentos: Tendencias en los modelos de digestión in vitro*. *Revista Doctorado UMH*, 2(2), 5. <https://doi.org/10.21134/doctumh.v2i2.1278>.
- Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A., Fernández-López, J. (2018). *In vitro digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges*. *Food Research International*, 107, 423–436. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.055>.
- Lucchetti, M.A., Glauser, G., Kilchenmann, V., Dübecke, A., Beckh, G., Praz, C., Kast, C. (2016). *Pyrrrolizidine alkaloids from *Echium vulgare* in honey originate primarily from floral nectar*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 5267–5273. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02320>
- Machado de Melo, A., Almeida- Muradian, L.B., Sancho, M.T., Pascual-Maté, A. (2018). *Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review*, *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 5-37, <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1338444>.
- Machado, A.M., Miguel, M.G., Vilas-Boas, M., Figueiredo, A.C. (2020). *Honey Volatiles as a fingerprint for botanical origin—A Review on their occurrence on monofloral honeys*. *Molecules*, 25, 374. <https://doi.org/10.3390/molecules25020374>
- Malheiro, J.F., Maillard, J., Borges, F., Simoes, M. (2018). *Evaluation of cinnamaldehyde and cinnamic acid derivatives in microbial growth control*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 141, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.06.003>.
- Mandalari, G., Bisignano, C., Filocamo, A., Chessa, S., Saro, M., Torre, G., Faulks, R. M., Dugo, P. (2013). *Bioaccessibility of pistachio polyphenols, xanthophylls, and tocopherols during simulated human digestion*. *Nutrition*, 29, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.08.004>
- Manina, L., Sobolev, A.P., Coppo, E., Di Lorenzo, A., Navavi, SM., Marchese, A., Daglia, M. (2016). *Actividad antiestafilocócica y perfil de metabolitos de la miel de manuka (*Leptospermum scoparium* L.) después de una digestión simulada in vitro*. *Función de alimentos*, 7, 1664–1670.
- Manyi-Loh, C. E., Clarke, A. M., NDIP, R. N. (2011). *An overview of honey: Therapeutic properties and contribution in nutrition and human health*. *African Journal of Microbiology Research* 5(8), 844-852. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.008>
- Maringgal, B., Hashim, N., Intan, Syafinaz, M. A., Mahmud Tengku, M. M., Hazwan, Hamzah, M., Mohd Ali, M., Faizol Haffiz, A. R. (2020) *Kinetics of quality changes in papayas (*Carica papaya* L.) coated with Malaysian stingless bee honey*. *Scientia Horticulturae*, 267, 109321. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109321>
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, M., Tuñón, M.^a J. (2002) *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*. *Nutrición Hospitalaria*, XVII (6) 271-278.
- Mato, I. (2004). *Importancia de los ácidos orgánicos no aromáticos en la miel*. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Mauricio, A. (1975). *Microscopy of honey*. In: E. Crane (ed.), *Honey: a comprehensive survey*. London, England. pp: 240-257.
- Mavric, E., Wittmann, S., Barth, G., Henle, T. (2008). *Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand*. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(4), 483-489. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700282>
- Mazón, M. (2021). *Comparación de la microextracción en fase sólida y del espacio de cabeza dinámico como técnicas de extracción de la fracción volátiles de mieles*. Universitat Politècnica de València. Tesis de máster. <http://hdl.handle.net/10251/174293>.

- Meda, A.C.E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O.G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91, 571–577. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.006>.
- Meo, S. A., Al-Asiri, S. A., Mahesar, A. L., Ansari, M. J. (2017). Role of honey in modern medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24 (5), 975-978. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.010>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodtkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>.
- Miyague, L., Macedo, R.E.; Meca, G., Holley, R.A., Luciano, F.B. (2015). Combination of phenolic acids and essential oils against *Listeria monocytogenes*. *LWT-Food Science and Technology*, 64, 333–336. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.055>
- Mohapatra, D.P., Thakur, V., Brar, S.K. (2011). Antibacterial efficacy of raw and processed honey. *Biotechnology Research International*, 2011, ID 917505, <https://doi.org/10.4061/2011/917505>.
- Moharram, H. A., Youssef, M.M. (2014). Methods for determining the antioxidant activity: a review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology* 11 (1), 31-42.
- Molan, P. C. (1992). The antibacterial activity of honey I. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*, 73, 5-28. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1992.11099109>
- Molan, P.C. (2006). La evidencia que apoya el uso de la miel como apósito para heridas. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 5(1), 40-54. <https://doi.org/10.1177/1534734605286014>
- Moniruzzaman, M., Rodríguez, I., Ramil, M., Cela, R., Sulaiman, S.A., Gan, S.H. (2014). Assessment of gas chromatography time-of-flight accurate mass spectrometry for identification of volatile and semi-volatile compounds in honey. *Talanta* 129, 505-515 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.06.019>
- Muckenschnabel, I., Bernhardt, G., Spruss T., Dietl, B., Buschauer, A. (1998). Quantitation of hyaluronidases by the Morgan-Elson reaction: comparison of the enzyme activities in the plasma of tumor patients and healthy volunteers. *Cancer Letters*, 131(1), 13-20. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(98\)00196-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(98)00196-7)
- Munera, G. (2021). Análisis de la fracción volátil de mieles españolas aplicando microextracción en fase sólida. Tesis de Máster. Universitat Politècnica de València. <http://hdl.handle.net/10251/174294>.
- Muttakin, S., Moxon, T. E., Gouseti, O. (2019). In vivo, in vitro, and in silico studies of the GI tract. In *Interdisciplinary approaches to food digestion* (pp. 29–67). Springer Nature. ISBN: 978-3-030-03901-1.
- Nagai, T., Tanoue, Y., Kai, N., Suzuki, N. (2012). Functional property of honey from *Echium vulgare*. *Food and Nutrition Sciences*, 3, 614–620. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2012.35084>
- Neggad, A., Benkaci-Ali, F., Laurent, S., Ayata, G. (2021). A new method of extracting polyphenols from honey using a biosorbent compared to the commercial resin amberlite XAD2. *Journal of Separation Science*, 44, 2089– 2096. <https://doi.org/10.1002/jssc.202001221>.
- Nolan, V. C., Harrison, J., Jonathan, A.G. Cox. (2019). Disección de la composición antimicrobiana de la miel. *Antibiótics*, 8 (4), 251. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040251>
- O'sullivan, A. M., O'Callaghan, Y. C., O'Connor, T. P., O'Brien, N. M. (2013). Comparison of the antioxidant activity of commercial honeys, before and after invitro digestion. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 63(3), 167–171. <https://doi.org/10.2478/v10222-012-0080-6>.
- Oelschlaegel, S., Gruner, M., Wang, P.N., Boettcher, A., Koelling-Speer, I., Speer, K. (2012) Classification and characterization of manuka honeys based on phenolic compounds and methylglyoxal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7229–7237. <https://doi.org/10.1021/jf300888g>.

- Olofsson, T.C., Vasquez, A. (2008). Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Current Microbiology*, 57, 356–363. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9202-0>.
- OMS (2021). Organización Mundial de la Salud. Hipertensión. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>. Último acceso 11/07/2022.
- Oplatowska, M., Elliott, C.T., Huet, A.C., McCarthy, M., Mulder, P.P.J., Von Holst, C., Delahaut, F., Hans, P., Van Egmond, V., Campbell, K. (2014). Development and validation of a rapid multiplex ELISA for pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides in honey and feed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 757–770. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7488-7>
- Oroian, M., Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis, *Food Research International*, 74, 10-36. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.018>
- Ortiz Valbuena, A. (1992). Contribución a la denominación de origen de la miel de la Alcarria. Tesis doctoral. Facultad Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.
- Ortiz Valbuena, A., Fernández Maeso, F. A., Subrá Muñoz de la Torre, E. (1996). Principales características de la miel de la Alcarria. Consejería de Agricultura y Ambiente de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, España.
- Ortiz-Chao, P., Gómez-Ruiz, J. A., Rastall, R. A., Mills, D., Cramer, R., Pihlanto, A., Korhonen, H., Jauregi, P. (2009). Production of novel ACE inhibitory peptides from β -lactoglobulin using Protease N Amano. *International Dairy Journal*, 19, 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.07.011>
- Oryan, A., Alemzadeh, E., Moshiri, A. (2016). Propiedades biológicas y actividades terapéuticas de la miel en la cicatrización de heridas: una revisión narrativa y un metanálisis. *Journal of Tissue Viability*, 25, 98–118.
- Osés, S. M., Nieto, S., Rodrigo, S., Pérez, S., Rojo, S., Sancho, M.T., Fernández-Muiño, M.A. (2020). Authentication of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honeys from southern Europe based on compositional parameters and biological activities. *Food Bioscience*, 38, 100768. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100768>
- Osés, S.M., Pascual-Matè, A., de la Fuente, D., de Pablo, A., Fernández-Muiño, M.A., Sancho, M.T. (2016). Comparison of methods to determine antibacterial activity of honeys against *Staphylococcus aureus*. *NJAS-Wageningen Journal of Life Science*, 78(1), 29-33, <https://doi.org/10.1016/j.njas.2015.12.005>
- Otero-Salinas, A., Meneses-Pérez, J., Karina Águila-Sánchez, K. (2018). Propiedades curativas de la miel: un edulcorante natural proveniente de los principales polinizadores de las plantas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Ciencias Biológicas. Licenciatura en Biotecnología Puebla, Puebla, México.
- Ouchemoukh, S., Amessis- Ouchemoukh, N., Gómez-Romero, M., Aboud, F., Giuseppe, A., Fernández-Gutiérrez, A., Segura Carretero, A. (2017). Characterisation of phenolic compounds in Algerian honeys by RP-HPLC coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. *LWT-Food Science and Technology*, 85, 460-469. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.084>
- Owoyele, B.V., Oladejo, R.O., Ajomale, K., Ahmed, R.O., Mustapha, A. (2014) Analgesic and anti-inflammatory effects of honey: the involvement of autonomic receptors. *Metabolic Brain Disease*, 29, 167–173. <https://doi.org/10.1007/s11011-013-9458-3>.
- Pala, F.S., Gürkan, H., (2008). The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases. *Advances in Molecular Biology*, 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.1995.tb01638.x>.
- Parkar, S. G., Jobsis, C. M. H., Herath, T. D., Stoklosinski, H. M., Van Klink, J. W., Sansom, C. E., ... Hedderley, D. I. (2017). Metabolic and microbial responses to the complexation of manuka honey with α -cyclodextrin after simulated gastrointestinal digestion and fermentation. *Journal of Functional Foods*, 31, 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.01.049>

Pașca, C., Mărghitas, L.A., Matei, I.A., Bonta, V., Mărgăoan, R., Copaciu, F., Bobis, O., Campos, M.G., Dezmiorean, D.S. (2021). Screening of some romanian raw honeys and their probiotic potential evaluation. *Applied sciences*, 11, 5816. <https://doi.org/10.3390/app11135816>.

Pascual-Maté A., Osés, S.M., Fernández-Muiño, M.A., Sancho, M.T. (2018). Analysis of polyphenols in honey: Extraction, separation and quantification procedures, *Separation and purification Reviews*, 47, 2, 142-158, <https://doi.org/10.1080/15422119.2017.1354025>.

Pastoriza, S., Delgado-Andrade, C., Haro, A., Rufián-Henares J.A. (2011) A physiologic approach to test the global antioxidant response of foods. The GAR method. *Food Chemistry* 129, 1926–1932. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.009>.

Paulus, H., Kwakman, S., Zaat, S.A.J. (2012). Antibacterial components of honey. *IUBMB Life* 64(1), 48-55. <https://doi.org/10.1002/iub.578>

Pekal, A., Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods* 7(9), 1776-1782. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>

Pérez, A., González-Manzano, S., Jimenez, R., Perez-Abud, R., Haro, J.M., Osuna, A., Santos-Buelga, C., Duarte, J., Perez-Vizcaino, F. (2014). The flavonoid quercetin induces acute vasodilator effects in healthy volunteers: Correlation with beta-glucuronidase activity. *Pharmacological Research*, 89, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.07.005>.

Pérez, R.A., Sánchez-Brunete, C., Calvo, R.M., Tadeo, J.L. (2002). Analysis of volatiles from Spanish honeys by solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2633–2637. <https://doi.org/10.1021/jf011551r>.

Perna, A., Intaglietta, I., Simonetti, A., Gambacorta, E. (2013). A comparative study on phenolic profile, vitamin C content and antioxidant activity of Italian honeys of different botanical origin. *International Journal of Food Science and Technology*, 48 (9), 1899-1908. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12169>

Petretto, G. L., Cossu, M., Alamanni, M. C. (2015). Phenolic content, antioxidant and physico-chemical properties of Sardinian monofloral honeys. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 482–491. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12652>

Piana G., Ricciardelli G., Isola, A. (1989). *La miel: alimento de conservación natural, origen*, ISBN: 84-7114-241-4. Editorial Mundi Prensa.

Pichichero, E., Canuti, L., Canini, A. (2009). Characterisation of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89 (4), 609-616. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3484>.

Piscopo, M., Tenore, G.C., Notariale, R., Maresca, V., Maisto, M., De Ruberto, F., Heydari, M., Sorbo, S., Basile, A. (2020). Antimicrobial and antioxidant activity of proteins from Feijoa sellowiana Berg. fruit before and after in vitro gastrointestinal digestion. *Natural Product Research*, 34, 2607–2611. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1675655>.

Pita-Calvo, C., Vázquez, M. (2017). Differences between honeydew and blossom honeys: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 59, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.015>.

Plutowska, B., Chmiel, T., Dymerski, T., Wardencki, W. (2011). A headspace solid-phase microextraction method development and its application in the determination of volatiles in honeys by gas chromatography. *Food Chemistry*, 126, 1288–1298. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.079>.

Półtorak, A., Marcinkowska-Lesiak, M., Lenzion K., Onopiuk, A., a Moczowska, M., Iwona Wojtasik-Kalinowska, I., Wierzbicka, A. (2019) The effect of bioactive components of plant origin on the physicochemical and sensory characteristics of functional sausages. *Food Science and Technology*, 39 (1). <https://doi.org/10.1590/fst.03018>

Półtorak, A., Marcinkowska-Lesiak, M., Lenzion, K., Moczowska, M., Onopiuk, A., Wojtasik-Kalinowska, I., Wierzbicka, A. (2018). Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and

antimicrobial effects of catuaba, galangal, roseroot, maca root, guarana and polyfloral honey in sausages during storage. *LWT-Food Science and Technology*, 96, 364-370. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.035>

Postmes, T. (2001). *Honey and Heal*, IBRA; Apnl2001; pp 49, Dr. P. Munn, 00-44-29 20 66 5522.

Poulter, N. (2003) Global risk of cardiovascular disease. *Heart*, 89, 2–5. https://doi.org/10.1136/heart.89.suppl_2.ii2.

Preti, R., Tarola, A.M. (2022). Chemometric evaluation of the antioxidant properties and phenolic compounds in Italian honeys as markers of floral origin. *European Food Research and Technology*, 248, 991–1002. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03939-z>.

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4303.

Prosen, H., Kokalj, M., Damjan, J., Samo, K. (2010). Comparison of isolation methods for the determination of buckwheat volatile compounds. *Food Chemistry* 121(1), 298-306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.014>.

Quiñones M., Miguel, M., Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria* 27(1), 76-89.

Radovic, B.S., Careri, M., Mangia, A., Musci, M., Gerboles, M., Anklam, E. (2001). Contribution of dynamic headspace GC-MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. *Food Chemistry*, 72, 511-522. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00263-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00263-6).

Ramos-Escudero, F., Casimiro-Gonzales, S., Fernández-Prior, A., Cancino Chávez, K., Gómez-Mendoza, J., de la Fuente-Carmelino, L., Muñoz, A.M. (2021). Colour, fatty acids, bioactive compounds, and total antioxidant capacity in commercial cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *LWT-Food Science and Technology*, 147, 111629. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111629>.

Ranjbari, E., Biparvab, P., Hadjmohammadi, M.R. (2012). Utilization of inverted dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-UV as a sensitive and efficient method for the extraction and determination of quercetin in honey and biological samples. *Talanta*, 89, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.11.079>.

Rao, P. V., Krishnan, K. T., Salleh, N., Gan, S. H. (2016). Biological and therapeutic effects of honey produced by honeybees and stingless bees: a comparative review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26, 657-664. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.01.012>

Rasines, S. Tutora Sandra María Osés Gómez. Análisis de fenoles y actividad antimicrobiana de mieles antes y después de la digestión in vitro (2019). Trabajo fin de grado. Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos. Universidad de Burgos.

Rintoul G. (2002). Chemical fingerprinting of the volatile fraction of species-specific floral Australian honeys. Thesis submitted to the School of Land and Food Sciences. University of Queensland. <https://doi.org/10.14264/uql.2018.570>.

Rodríguez Terradillos, S. (2018). Estudio de compuestos volátiles y semivolátiles en propóleos. Trabajo fin de Máster en Seguridad y Bioseguridad Alimentaria. Universidad de Burgos.

Rodríguez-Romero, B.A. (2012). Caracterización química y evaluación de las actividades antioxidantes y antimicrobiana de mieles florales. naranjo, cactáceas y manzanilla. Ph. D. Thesis, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

Rowland C.Y., Blackman, A. J., D'Arcy, B.R., Rintoul, G.B. (1995). Comparison of organic extractives found in leatherwood (*Eucalyptus lucida*) honey and leatherwood flowers and leaves. *Journal of Agriculture Food and Chemistry*, 43,753-763. <https://doi.org/10.1021/jf00051a036>.

Rozaini, M.Z., Zuki A.B.Z., Norimah, Y., Noordin, M.M., Muhammad, A. (2012). *Gelam (Melaleuca spp.) Honey-Based Hydrogel as Burn Wound Dressing. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID 843025, 7* <https://doi.org/10.1155/2012/843025>.

Rozaini, M.Z., Zuki, A.B.Z., Noordin, M.M., Norimah, Y., Muhammad, A. (2004). *El efecto de la aplicación tópica de miel de Malasia en la cicatrización de heridas por quemaduras, Jurnal Veterinar Malaysia, 1 y 2, 47-50.*

Rufián-Henares, J. A., Delgado-Andrade, C. (2009). *Effect of digestive process on Maillard reaction indexes and antioxidant properties of breakfast cereals. Food Research International, 42, 394-400.* <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.01.011>

Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Zaldivar-Cruz, J.M., Kuri, V., Pérez-Álvarez, J.A. (2011). *Antioxidant activity of artisanal honey from tabasco, Mexico, International Journal of Food Properties, 14 (2), 459-470,* <https://doi.org/10.1080/10942910903249480>.

Sabatini, A.G. (2007). *Il miele: Origine, composizione e proprietà*. In A.G. Sabatini, L. Botolotti, G.L. Marcazzan (Eds.), *Conoscere il miele* (pp. 3–37). Bologna-Milano: Avenue Media, Bologna, Italia.

Sáenz, C., Gómez, C. (2000). *Mieles españolas. Características e Identificación Mediante el Análisis Del Polen. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. ISBN 9788471148773.*

Samarghandian, S., Afshari, J.T., Davoodi, S. (2011) *Honey induces apoptosis in renal cell carcinoma. Pharmacognosy Magazine, 7, 46-52.* <https://doi.org/10.4103/0973-1296.75901>.

Sánchez, M., Galisteo, M., Vera, R., Villar, I.C., Zarzuelo, A., Tamargo, J., Pérez-Vizcaino, F., Duarte, J. (2006). *Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. Journal of Hypertension, 24, 75–84.* <https://10.1097/01.hjh.0000198029.22472.d9>

Sancho, M.T., Pascual-Mate, A., Rodríguez-Morales, E.G., Osés, S.M., Escriche, I., Periche, A., Fernández-Muiño, M.A. (2016). *Critical assessment of antioxidant-related parameters of honey. Journal of Food Science and Technology, 2016, 51, 30–36.* <https://doi.org/10.1111/jjfs.12988>.

Sanz, M. L., González, M.M., Martínez-Castro, I. (2002). *Los azúcares de la miel. In De Lorenzo, C (Ed). La miel de Madrid. Consejería de Economía e Innovación Tecnológica. Comunidad de Madrid. Instituto Madrileño de investigación Agraria y alimentaria. pp. 95-108. ISBN:84-451-2284-3.*

Sanz, M.L., Polemis, N., Morales, V., Corzo, N., Drakoularakou, A., Gibson, G.R., Rastall, R.A. (2005). *In vitro investigation into the potential prebiotic activity of honey oligosaccharides. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 2914–2921.* <https://doi.org/10.1021/jf0500684>.

Saxena, S., Gautam, S., Maru, G., Kawle, D., Sharma, A. (2012). *Suppression of error prone pathway is responsible for antimutagenic activity of honey. Food and Chemical Toxicology, 50, 625-633.* <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.01.003>.

Schramm, D. D., Karim, M., Schrader, H. R., Holt, R. R., Cardetti, M., Keen, C. L. (2003). *Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 1732-1735.* <https://doi.org/10.1021/jf025928k>

Seraglio S. K., Mayara Schulz, T., Valdemiro Gonzaga, L., Fett, R., Oliveira Costa, A.C. (2021). *Current status of the gastrointestinal digestion effects on honey: A comprehensive review, Food Chemistry, 357, 129807.* <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129807>.

Seraglio, S. K. T., Silva, B., Bergamo, G., Brugnerotto, P., Gonzaga, L. V., Fett, R., Costa, A. C. O. (2019). *An overview of physicochemical characteristics and health promoting properties of honeydew honey. Food Research International, 119, 44–66.* [10.1016/j.foodres.2019.01.028](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.028).

Seraglio, S. K. T., Valse, A. C., Daguer, H., Bergamo, G., Azevedo, M. S., Nehring, P., Gonzaga, L. V., Fett, R., Costa, A. C. O. (2016). *Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in honeydew honeys with the diluted-and-shoot approach. Food Research International, 87, 60-67.* <https://doi.org/10.1021/jf025928k10.1016/j.foodres.2016.06.019>.

- Seraglio, S. K. T., Valese, A. C., Daguer, H., Bergamo, G., Azevedo, M. S., Nehring, P., Gonzaga, L. V., Fett, R., Costa, A. C. O. (2017). Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds, minerals, and antioxidant capacity of *Mimosa scabrella* Benth honeydew honeys. *Food Research International*, 99, 670–678. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.024>
- Serra, J., Ventura, F. (2003). Flavour index and aroma profiles of fresh and processed honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 275–282. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1308>.
- Shani-Levi, C., Alvito, P., Andrés, A., Assunção, R., Barbera, R., Blanquet-Diot, S., ... Lesmes, U. (2017) Extending *in vitro* digestion models to specific human populations: Perspectives, practical tools and bio-relevant information. *Trends in Food Science and Technology*, 60, 52–63. <http://hdl.handle.net/10251/137418>
- Sies, H. 1997. Oxidative stress, oxidants and antioxidants. *Experimental physiology* 82, 291-2. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>.
- Simon, A., Traynor, K., Santos, K., Blaser, G., Bode, U., Molan, P. (2009). Medical honey for wound care-Still the “latest resort”? *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 6(2), 165-173. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem175>
- Snowdon, J. A., Cliver, D. O. (1996). Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*, 31, 1-26. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)00970-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)00970-1)
- Sobrino, L. (2020). *Avances en el esclarecimiento de la autenticidad de la miel*. Tesis doctoral. Universidad politécnica de Valencia.
- Socha, R., Juszczak, L., Pietrzyk, S., Fortuna, T. (2009). Antioxidant activity and phenolic composition of herb honeys. *Food Chemistry*, 113, 568–574. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.029>
- Soria A.C., González M., Lorenzo C., Martínez-Castro I., Sanz J. (2005). Estimation of the honeydew ratio in honey samples from their physicochemical data and from their volatile composition obtained by spme and CG-MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 817-824. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1890>
- Sousa, J. M., de Souza, E.L., Marques, G., Benassi, M., Beatriz, Gullón, B., Pintado, M.M., Magnani, M. (2016). Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region, *LWT - Food Science and Technology*, 65, 645-651. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.058>
- Statista (2022). Ranking de los principales países productores de miel a nivel mundial en 2020, por volumen de producción. Disponible en: <https://es.statista.com/estadisticas/612365/principales-paises-productores-de-miel-a-nivel-mundial/>. Último acceso 30 de junio de 2022.
- Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas. (2021). *Indicadores económicos sector apícola 2020. El sector apícola español en 2020: Principales magnitudes e indicadores económicos*. Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/en/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoreseconomicossectorapicola2020_tcm38-576093.pdf. Último acceso: 14/01/2022.
- Takahashi, T., Kawai M.I., Okuda, R., Suzuki, K. (2003). A fluorimetric Morgan–Elson assay method for hyaluronidase activity. *Analytical Biochemistry*, 322, 257-263. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.08.005>
- Tanleque-Alberto, F., Juan-Borrás, M., Escriche, I. (2020). Antioxidant characteristics of honey from Mozambique based on specific flavonoids and phenolic acid compounds, *Journal of Food Composition and Analysis*, 86, 103377. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103377>.
- Taormina, P. J., Niemira, B. A., Beuchat, L. R. (2001). Inhibitory activity of honey against food borne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 217–225. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00505-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00505-0)

Terradillos, L.A., Muniategui, S., Sancho, M.T., Huidobro, J.F., Simal-Lozano J. (1994). An alternative method for analysis of honey sediment. *Bee Science*, 3, 86-93.

Terzo, S., Mulè, F., Amato, A. (2020). Honey and obesity-related dysfunctions: A summary on health benefits. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 82, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108401>.

Tomás-Barberán, F.A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B.S. y Anklam, E. (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 485-496. <https://doi.org/10.1002/jsfa.836>.

Tosi, E., Ortega, M., Martinet, R. (2000). Determinación Espectrofotométrica de la Glucosa Oxidasa en miel. *Alimentaria*, 312, 97-99.

Tsiapara, A.V., Jaakkola, M., Chinou, I., Graikou, K., Tolonen, T., Virtanen, V., Moutsatsou, P. (2009). Bioactivity of greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: Profile analysis of extracts, *Food Chemistry*, 116 (3), 702-708. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.024>

Turkmen, N., Sari, F., Poyrazoglu, E. S., Velioglu, Y. S. (2006). Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry* 95, 653–657. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.004>

Valdez Palomino, R. (2014) Contenido de fenoles totales y flavonoides totales en *Oenothera rosea* Ait "yawar suqu", *Baccharis salicifolia* R&P "chilca" y *Piper elongatum* Vahl "matico". Tesis doctoral. Universidad nacional de San Cristobal de Huamanga. Ayacucho. Perú.

Valls Puig, J. (2004). Validación de metodologías de cromatografía líquida de alta resolución en alimentos. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/307634220_Validacion_de_metodologias_de_cromatografia_a_liquida_de_alta_resolucion_en_alimentos. Último acceso 18/06/2022.

Vazquez, L., Armada, D., Celeiro, M., Dagnac, T., Llompert, M. (2021). Evaluating the presence and contents of phytochemicals in honey samples: Phenolic Compounds as Indicators to Identify Their Botanical Origin. *Foods*, 10, 2616. <https://doi.org/10.3390/foods10112616>

Verzera, A., Conduurso, C. (2012). Sampling Techniques for the Determination of the Volatile Fraction of Honey. *Comprehensive sampling and sample preparation: analytical techniques for scientists*, 4, 87-117. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00129-0>

Vetrani, C., Rivellese, A. A., Annuzzi, G., Adiels, M., Boren, J., Mattila, I., Oresic, M., Aura, A. M. (2016). Metabolic transformations of dietary polyphenols: Comparison between in vitro colonic and hepatic models and in vivo urinary metabolites. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 33, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.03.007>

Viedma, S. (2020). "miel" alternativa natural en heridas, úlceras y quemaduras. Trabajo fin de grado. Facultad Ciencias de la Salud. Jaén.

Visquert, M. (2015). Influencia de las condiciones térmicas en la calidad de la miel. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.

Vit, P., Vargas, O., zTriny, L., Valle, F.M. (2015). Meliponini biodiversity and medicinal uses of pot-honey from El Oro province in Ecuador. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27(6), 502-506. <http://dx.doi.org/10.9755/ejfa.2015.04.079>

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A. (2008) Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science*, 73(9), 117-124. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x>.

Voidarou, C., Alexopoulos, A., Plessas, S., Karapanou, A., Mantzourani, I., Stavropoulou, E., Fotou, K., Tzora, A., Sdoufos, I., Bezirtzoglou, E. (2011). Antibacterial activity of different honeys against pathogenic Bacteria. *Anaerobe*, 17, 6, 375-379. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.03.012>.

- Von Der Ohe, W., Persano, Oddo L., Piana, M.L. Morlot, M., Martin, P. (2004). Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35, S18-S25. <https://doi.org/10.1051/apido:2004050>.
- Wallace, A., Eady, S., Miles, M., Martin, H., McLachlan, A., Rodier, M., Willis, J., Scott, R., Sutherland, J. (2009). Demonstrating the safety of manuka honey UMF® 20+ in a human clinical trial with healthy individuals. *British Journal of Nutrition*, 103, 1023-1028. <https://doi.org/10.1017/S0007114509992777>
- Wang, X. H., Andrae, L., Engeseth, N. J. (2002). Antimutagenic effect of various honeys and sugars against Trp-p-1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6923-6928. <https://doi.org/10.1021/jf025641n>.
- Watanabe, K., Rahmasari, R., Matsunaga, A., Haruyama, T., Kobayashi, N. (2014). Anti-influenza viral effects of honey in vitro: Potent high activity of manuka honey. *Archives of Medical Research*, 45, 359-365. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.05.006>.
- Weston, R. J. (2000). The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry*, 71, 235-239. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00162-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00162-X).
- Weston, R.J., Mitchell, K.R., Allen, K.L. (1999). Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. *Food Chemistry*, 64, 295-301.
- White, J. W., Subers, M. H., Schepartz, A. I. (1963). The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 73, 57-70. [https://doi.org/10.1016/0926-6569\(63\)90108-1](https://doi.org/10.1016/0926-6569(63)90108-1)
- White, J.R., J.W., Subers, M.H. (1964). Studies on honey inhibine. 3. Effect of heat. *Journal of Apicultural Research*, 3, 45-50. <https://doi.org/10.1080/00218839.1964.11100082>
- White, J.W., Rudyj, O.N. (1978). The protein content of honey. *Journal of Apicultural Research*, 17, 234-238. <https://doi.org/10.1080/00218839.1978.11099932>
- Woller, T. (2021). Mercado Internacional de la Miel 2020-2021. Disponible en: <https://docplayer.es/220845010-Mercado-internacional-de-la-miel-thierry-woller.html>. Último acceso: 30/06/2022.
- Woo, K.J., Jeong, Y.J., Inoue, H., Park, J.W., Kwon, T.K. (2005). Chrysin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) DNA-binding activity. *FEBS Letters*, 579, 705-711. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.12.048>.
- Wootton, M., Edwards R. A., Faraji-Haremi, R., Johnson A.T., Williams P.J. (1978). Effect of accelerated storage conditions on the chemical composition and properties of Australian honeys. *Changes In Volatile Components. Journal of Apicultural Research*; 17(3); 167-172. <https://doi.org/10.1080/00218839.1978.11099921>.
- Xiao, Yu., Wanxiang, Yu., Xiaohui, Zhang., Yongjie, Wang., Shumei, Wang., Haiyun, Zhai. (2021). Simultaneous determination of flavonoids and anthraquinones in honey by using SPE-CE-LIF, *Analytical Biochemistry*, 631, 114373. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114373>.
- Yung An, C., Hossain, M., Alam, F., Islam, A., Khalil, I., Alam, N., Hua Gan, S. (2016). Efficiency of polyphenol extraction from artificial honey using C18 cartridges and Amberlite XAD-2 Resin: A comparative study. *Journal of Chemistry*, ID8356739. <https://doi.org/10.1155/2016/8356739>.
- Zeina, B., Zohra, B.I., Al- Assad, S. (1997). The effects of honey on Leishmania parasites: an in vitro study. *Tropical Doctor*, 27, 36-38.
- Zhao, H., Cheng, N., Zhou, W., Chen, S., Wang, Q., Gao, H., Xue, X., Wu, L., Cao, W. (2019). Honey polyphenols ameliorate DSS-induced ulcerative colitis via modulating gut microbiota in rats. *Molecular Nutrition and Food Research*, 63, 1900638. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900638>.

Zhou, Q., Wintersteen, C.L., Cadwallader, K.R. (2002). Identification and quantification of aroma-active components that contribute to the distinct malty flavor of buckwheat honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2016-2021. <https://doi.org/10.1021/jf011436g>

Živkov Baloš, M.M., Popov, N.S., Prodanov Radulović, J.Z., Stojanov, I.M., Jakšić, S.M. (2020). Sugar profile of different floral origin honeys from Serbia. *Journal of Apicultural Research*, 59 (4), 398-405. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1714193>

ANEXO I

Article

Chemical Extraction and Gastrointestinal Digestion of Honey: Influence on Its Antioxidant, Antimicrobial and Anti-Inflammatory Activities

Marta Alevia, Sandra Rasines, Leire Cantero , M. Teresa Sancho * , Miguel A. Fernández-Muiño * and Sandra M. Osés 

Department of Biotechnology and Food Science, University of Burgos, Pza. Misael Bañuelos s/n, 09001 Burgos, Spain; maa1011@alu.ubu.es (M.A.); srm0041@alu.ubu.es (S.R.); lcantero@ubu.es (L.C.); smoses@ubu.es (S.M.O.)

* Correspondence: mtsancho@ubu.es (M.T.S.); mafernan@ubu.es (M.A.F.-M.); Tel.: +34-947-259506 (M.A.F.-M.)

Abstract: The effect of chemical extraction and in vitro digestion of different kinds of honey on bioactive compounds (total phenolic compounds and flavonoids) and biological activities (antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory) was investigated. The antioxidant activity was evaluated against three radicals (ABTS^{•+}, ROO[•], •OH), and the antimicrobial activity was studied against five bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* and *Pseudomonas aeruginosa*) and one yeast (*Candida albicans*). The results show that in comparison with raw honeys, the methanolic extracts exhibited lower values for phenols, flavonoids and antioxidant activity and higher anti-inflammatory and antimicrobial activities against *L. monocytogenes*. The higher anti-inflammatory activity indicates a possible use of dried honey extracts in the pharmaceutical and cosmetic industries. The digested honeys showed higher total phenolics and higher antioxidant activity than the pre-digested honeys, as well as higher antimicrobial activity against *S. aureus* and *L. monocytogenes*, which underlines the possible antioxidant and antimicrobial effects of honey in the human body after the digestion process.

Keywords: honey; in vitro digestion; phenolic extract; antioxidant activity; antimicrobial activity; anti-inflammatory activity



Citation: Alevia, M.; Rasines, S.; Cantero, L.; Sancho, M.T.; Fernández-Muiño, M.A.; Osés, S.M. Chemical Extraction and Gastrointestinal Digestion of Honey: Influence on Its Antioxidant, Antimicrobial and Anti-Inflammatory Activities. *Foods* **2021**, *10*, 1412. <https://doi.org/10.3390/foods10061412>

Academic Editor: Maria da Graça Costa G. Miguel

Received: 27 May 2021
Accepted: 15 June 2021
Published: 18 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Honey is a complex natural product produced by bees from flower nectar or tree and plant exudates, usually involving plant-sucking insects. This product has been used since ancient times mainly as a sweetening agent but has also been used for its therapeutic capacity [1]. Honey is a mixture of carbohydrates, especially glucose and fructose (60–85%), water (14–22%) and minority compounds including phenolic compounds, minerals, proteins, enzymes, free amino acids, organic acids and vitamins [2]. Phenolic compounds, especially phenolic acids and flavonoids, are important for their functional properties, and their concentration shows a large variation depending on the botanical origin of honey [3].

Due to its composition, honey was traditionally used for medicinal applications. Its beneficial properties include mainly antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activities [4,5]. Honey's total phenolic compounds and the biological properties of honey have been extensively studied in different types of honey from all over the world [6–9]; however, there are few studies that assess the biological activities of their alcoholic extracts where these phenolic compounds are concentrated, and which can be used as additives in food, pharmaceutical and cosmetic industries.

There are also few studies investigating the effect of digestion on honeys' bioactive compounds. This information is very important, as bioactive compounds that are not degraded during digestion (bioaccessibility) may be available for absorption, especially in

the gut, promoting biological action (bioavailability) [10]. In vitro bioaccessibility studies are useful to study the release of bioactive compounds from honey and their stability under gastrointestinal conditions [3]. An extensive literature review only showed six papers that studied the effect of in vitro digestion on phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activities of honey [3,11–15] and one review [16]. All the mentioned papers roughly followed the same protocol. In none of them was the simulation of the oral phase carried out, mainly because honey is not a solid food, and during its production by bees, this process is partially performed, although it may be interesting to study its effect on honey. The main components of honey are monosaccharides (fructose and glucose) that are absorbed with no modification. Digestion in the large intestine may be of interest for some minority components with functional activities. The major difference between the honey-digestion studies was related to the honey dilution before digestion. Cianciosi et al. [11] used 10 g of honey dissolved in 100 mL milliQ water, Daglia et al. [12] and Mannina et al. [15] used 20 g in 10 mL water, and O'Sullivan et al. [13] used 0.5 g in 10 mL water. It is likely that those different concentrations could influence the values of the analyzed activities, making it difficult to compare results.

The aim of this study was to analyze, in quantitative–qualitative fashion, total phenols and flavonoids, and evaluate the antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities of 15 honeys before and after in vitro digestion, as well as their methanolic extracts in order to determine whether gastrointestinal digestion and/or chemical extraction can modify the functional properties of raw honeys.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Ethanol, methanol, sodium carbonate, sodium chloride, sodium hydroxide, potassium persulfate, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, EDTA, acetic acid, formic acid, hydrochloric acid, p-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB), Baird Parker agar base (BP) and Trypone bile x-glucuronide agar (TBX) were acquired from the VWR International Eurolab, part of Avantor (Llinars del Vallés, Cataluña, Spain). Gallic acid (GA), NaNO_2 and catechin (Cat) were acquired from Panreac (Barcelona, Spain). AlCl_3 and fluorescein sodium were acquired from Fluka Chemie GmbH, part of Sigma-Aldrich (Buch, San Galo, Switzerland). Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 and Microinstant Listeria Agar base (Ottaviani and Agosti) (MLA) were acquired from Scharlab (Sentmenat, Spain). Potassium tetraborate, sodium benzoate and uric acid (UA) were purchased from Alfa Aesar, part of Thermo Fisher (Kanderl, Germany). α -amilase, pepsin, pancreatin, bile salts, Folin–Ciocalteu reagent, 2,2'-azino-bis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox, T), H_2O_2 , thiobarbituric acid, KH_2PO_4 , 2,2'-azobis (2-amidopropane) dihydrochloride (ABAP), N-acetyl-D-glucosamine (NAG), hyaluronic acid sodium salt (HA) from *Streptococcus equi*, bovine serum albumin (BSA), hyaluronidase from bovine testes type IV-S (1400 U/mL) and glycerol were acquired from Sigma-Aldrich part of Merck (Steinheim, Germany). Nutrient broth No. 2 (NB), malt extract broth (MEB), brain–heart infusion (BHI), agar technical NO. 1 and Ringer solution were acquired from Oxoid, part of Thermo Fisher (Basingstoke, Hampshire, UK). Water was deionized using a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). Spectrophotometric analysis was performed on a Varian Cary Bio 400 spectrophotometer (Varian, part of Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and the fluorimetric analysis by using a fluorometer Varioskan LUX microplate reader (Thermo Fisher, Kanderl, Germany).

2.2. Samples

The study was conducted on 15 honeys of different botanical and geographical origins collected in autumn 2016 in Castilla y León (Spain) from individual apiaries. Melissopalynology [17–19] and sensory analysis [20,21] showed that there were 4 honeydew honeys (RH1–RH4), 3 viper's tail honeys (*Echium* spp.) (RH5–RH7), 5 heather honeys (*Calluna*

vulgaris and *Erica* spp.) (RH8-RH12) and 3 broom honeys (Leguminosae *Genista* spp.) (RH13-RH15) (Table 1).

Table 1. Botanical origin of the honey samples.

Honey Samples	Botanical Origin	Cientific Name
H1	Honeydew	
H2	Honeydew	
H3	Honeydew	
H4	Honeydew	
H5	Viper's bugloss/Blueweed	<i>Echium</i> sp.
H6	Viper's bugloss/Blueweed	<i>Echium</i> sp.
H7	Viper's bugloss/Blueweed	<i>Echium</i> sp.
H8	Ling heather	<i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull
H9	Ling heather	<i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull
H10	Ling heather	<i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull
H11	Ling heather	<i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull
H12	Ling heather	<i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull
H13	Broom	Leguminosae <i>Genista</i> sp.
H14	Broom	Leguminosae <i>Genista</i> sp.
H15	Broom	Leguminosae <i>Genista</i> sp.

2.3. Chemical Extraction

Methanolic extracts of honey (ME1-ME15) were obtained following the method proposed by Baltrušaityte et al. [22]. 25 g of honey was dissolved in 250 mL of distilled water, adjusting the pH to 2 with concentrated HCl. The diluted sample was passed through a column (300 × 15 mm) with Amberlite XAD-2 resin (Supelco, Bellefonte, PA, USA), pre-conditioned with methanol and distilled water. The column was then washed with 250 mL of acidified water (pH 2 with HCl) and 300 mL of neutral distilled water to remove sugars and other interferents. Finally, the phenolic compounds were eluted with 250 mL methanol and the phenolic extracts were evaporated to dryness using a rotary evaporator. They were then re-dissolved in 25 mL of HPLC-grade methanol. In order to perform all the analyses foreseen for this study for each honey, 2 extractions were performed, and both extracts were then homogenized. The methanolic extracts were stored at −20 °C until analysis.

2.4. Simulated In Vitro Digestion

Samples were first subjected to oral digestion in accordance with the procedure performed by Pastoriza et al. [23]. Honey (1.25 g) was weighed and dissolved in 10 mL of milli-Q water. Then, 250 µL of α-amylase solution (3.25 mg of α-amylase dissolved in 2.5 mL of CaCl₂ 1mM pH 7) was added. The mixture was incubated in a water bath at 37 °C for 30 min, shaking at 110 oscillations/min. Following this step, gastric digestion and intestinal digestion were performed using the procedure adapted by Rufián-Henares and Delgado-Andrade [24]. For gastric digestion, the pH was adjusted to 2 with 6 M HCl and 1 mL of pepsin solution (0.4 g of pepsin dissolved in 2.5 mL of 0.1 M HCl) was added. The samples were incubated in a water bath at 37 °C for 2 h with shaking at 110 oscillations/min. For the intestinal phase, the pH was raised to 6 with 1 M NaHCO₃ and a solution of pancreatin and bile salts (0.1 g pancreatin + 0.625 g bile salts dissolved in 25 mL 0.1 M NaHCO₃) was added. The pH was subsequently adjusted to 7.5 with 1 M NaHCO₃ and the samples were incubated in a water bath at 37 °C for 2 h with shaking at 110 oscillations/min. After gastrointestinal digestion, digestive enzymes were inactivated by heat treatment for 4 min at 100 °C. Samples were cooled and centrifuged at 3550 rpm for 1 hour at 4 °C to separate bio-accessible (soluble) and non-accessible (insoluble) fractions. Subsequent analyses were performed only on the soluble fraction (DH1-DH15), due to the minimal amount of insoluble fraction obtained. Blank digestion was performed with milliQ water, subtracting its value from those obtained in the samples to eliminate the interaction of the enzymes used in the digestion.

2.5. Total Phenolics and Flavonoids Content

Total phenolics were measured in the raw honey samples (RH1–RH15), in the methanolic extracts (ME1–ME15) and after *in vitro* digestion (DH1–DH15). For the analysis of the raw honey samples, a dilution to 100 mg/mL with distilled water was performed in advance. Then, all samples were filtered with Whatman No. 40 paper. For the analysis of methanolic extracts and digested honey samples, the extract or the soluble fraction obtained after *in vitro* digestion was directly taken.

Total phenolics content was determined using the Folin–Ciocalteu reagent [25]. A unit of 0.5 mL of sample was mixed with 2.5 mL of 0.2 N Folin–Ciocalteu reagent. After 5 min, 2 mL of Na₂CO₃ (75 g/L) was added. After incubation of the mixture for 120 min in the dark at room temperature, the absorbance was measured at 760 nm. The standard for the calibration curve was GA (1–300 mg/L) prepared with 70% ethanol. Results were expressed as mg GA/100 g honey.

The total flavonol content was assessed by measuring the colour of aluminium-flavonoid complexes in alkaline medium [26]. 0.15 mL NaNO₂ (5% *w/v*) was added to each sample (0.5 mL). After 5 min, 0.25 mL of AlCl₃ (2% *w/v*, in methanol) was added. Within 6 min, the mixtures were neutralized with 0.25 mL of 1M NaOH. The absorbance was read at 510 nm against a water blank for RH and DH and a methanol blank for ME after 10 min at room temperature. Cat (1–80 µg/mL) was the standard used for the calibration curve. Results were expressed as mg Cat/100 g of sample.

2.6. Antioxidant Activities

Three different assays with different free radicals were used to assess the antioxidant activities of RH, ME and DH: Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), antioxidant activities against hydroxyl (AOA) and oxygen radical absorbance capacity (ORAC).

TEAC by ABTS procedure: TEAC was assayed according to the process described by Sancho et al. [27] in honeys, extracts and fractions obtained after *in vitro* digestion. ABTS^{•+} was generated by oxidation of a 7 mM ABTS stock solution with 2.45 mM potassium persulphate (1:1) in the dark for 16 h. Then, the ABTS^{•+} solution was diluted to obtain an absorbance between 0.70 and 0.80 at 734 nm. ABTS^{•+} solution (1490 µL) was added to 10 µL of sample (RH (500 mg/mL), ME or DH), standard or blank (distilled water for honeys and methanol for honey extracts and digests). The standard calibration curve was plotted using TE (0.625–3 mM) as standard, calculating the percentage inhibition after 6 min as follows: % inhibition = [(Ab – As)/Ab × 100], where Ab = absorbance of the blank, As = absorbance of the sample or standard. The results were given in µmol Trolox Equivalents (TE)/100 g honey.

Radical-scavenging activity on hydroxyl radicals (AOA assay): AOA was evaluated by the Koracevic et al. procedure [28]. Samples (10 µL) (RH 750 mg/mL, ME and HD) were mixed with 490 µL of sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4), 500 µL of sodium benzoate (0.01 M), 200 µL of FeSO₄-EDTA (2 mM) and 200 µL of hydrogen peroxide (0.01 M). Samples were then incubated for 1 h at 37 °C, after which the reaction was stopped by addition of 1 mL acetic acid (20%). Subsequently, 1 mL of thiobarbituric acid (0.8% *w/v*) in NaOH (50 mM) was added. The solution was boiled for 10 min and then cooled on ice. The absorbance of all samples was measured at 532 nm against distilled water. Each sample (A₁) had its own control (A₀), in which acetic acid (20%) was added before Fe-EDTA and H₂O₂. Negative controls (K₁ and K₀) were prepared by substituting the samples with phosphate buffer. Uric acid 1 mM in NaOH (5 mM) was used as standard (U₁ and U₀). Antioxidant activity was determined as mmol uric acid (UA)/100 g honey = f × (CU) × (K – A)/(K – U), where f is the dilution factor, CU is the concentration of uric acid (1 mM), K is the absorbance of the control (K₁ – K₀), A is the absorbance of the sample (A₁ – A₀) and U is the absorbance of the uric acid solution (U₁ – U₀).

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): ORAC values were assessed by a modified assay based on the Huang et al. procedure [29], using a 96-well white plate (Greiner Bio-one, San Sebastián de los Reyes, Madrid, Spain). Three microlitres of fluorescein

(4.1 μM) was added to 187 μL of sample (RH 100 mg/mL, ME and DH), buffer solutions (75 mM sodium phosphate, pH 7.4) or TE (0.2 μM) in a 96-well white plate at 37 °C for 5 min. ABAP (10 μL , 0.37 M) was added to the mixtures and the fluorescence (excitation wavelength 485 nm and emission wavelength 520 nm) was then recorded every 5 min for 90 min. Results were expressed as $\mu\text{mol TE per gram of honey} = ((\text{Sample area} - \text{Target area}) / ((\text{Trolox equivalent area} - \text{Target area}) / \mu\text{mol trolox}))$.

2.7. Anti-Inflammatory Activity

Anti-inflammatory activity was evaluated using a modified hyaluronidase inhibition assay [30]. Hyaluronidase activity was defined as one unit (U) of hyaluronidase catalyzing the release of 1 μmol of N-acetyl-D-glucosamine (NAG) per minute under specified conditions. A hyaluronic acid sodium salt stock solution (5 mg/mL) was prepared and stored at 4 °C. For the assay, 70 μL of hyaluronic acid stock solution and 100 μL of buffer (0.2 M sodium formate, 0.1 M NaCl and 0.2 mg/mL BSA, pH 3.68) were added to 200 μL of milliQ water and 50 μL of sample (RH 750 mg/mL, ME and DH). The mixture was heated at 37 °C for 10 min. The reaction was then initiated by adding 50 μL of hyaluronidase type IV-S (1400 U/mL) prepared in 0.9% NaCl, incubating the mixture in a water bath for 1 h at 37 °C and stopping the enzymatic reaction by addition of 100 μL of 0.8 M potassium tetraborate. The samples were then incubated for 3 min in a boiling water bath and then cooled to room temperature. After adding 750 μL of DMAB, the tubes were incubated for 20 min at 37 °C and then the absorbance at 586 nm was read against a blank sample, in which both enzyme and sample were replaced by buffer. Calibration curves were drawn with standard solutions of NAG (in the range between 0 and 2 μmol per test). Percent inhibition of hyaluronidase was calculated as follows: % inhibition = $(A - B) / A \times 100$, where A was μmol of NAG in the positive control and B was μmol of NAG from each sample reaction.

2.8. Antimicrobial Activity

Escherichia coli CECT 99, *Listeria monocytogenes* CECT 934, *Pseudomonas aeruginosa* CECT 108, *Streptococcus mutans* CECT 479, *Staphylococcus aureus* CECT 435, as well as a yeast, *Candida albicans* CECT 1394, were used in the assays. The cells were grown in NB for *S. aureus*, *Ps. aeruginosa* and *E. coli* and in BHI for *L. monocytogenes* and *St. mutans* for 24 h at 37 °C and in SEM for *C. albicans* for 24 h at 30 °C. Cell suspensions were diluted in sterile Ringer's solution to obtain initial cell counts of 6 log cfu/mL.

Minimum inhibitory concentration: antimicrobial activity was evaluated by broth dilution assay. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were estimated using different concentrations for each sample.

For raw honey, 37.5, 18.75, 9.38, 4.69, 2.34, 1.17 and 0.59% (*w/v*) were employed, except for *C. albicans*, where the used concentrations were 45, 41, 37.5, 18.75, 9.38, 4.69 and 2.34% (*w/v*). For ME, 90, 75, 60, 45, 30, 15, 5 and 1% (honey concentration from 450 to 5 mg/100 mL) were used, whereas for DH, 90, 75, 60, 50, 40, 25, 12.5 and 5% (honey concentration between 7.04 and 0.40 mg/100 mL) were used. In the case of DH, it was not possible to use higher honey concentrations, because in the soluble fraction obtained after digestion, the honey concentration was already 7.82% (1.25 g in 16 mL soluble fraction). All dilutions were made with the broth appropriate to each microorganism.

To evaluate antimicrobial activities, sterile 96-well round-bottom polystyrene microtitre plates (Brand, Wertheim, Germany) were employed. For each sample and for each microorganism, 900 μL of each dilution were made up in sterile Eppendorf tubes with broth. As a contamination control, one column was used for each sample. A unit of 180 μL of each Eppendorf dilution was added together with 20 μL of ringer. Additionally, 80 μL of 6 log CFU/mL of each microorganism was mixed with 720 μL of each sample dilution. In each well, 200 μL of the blend was added (three replicates per dilution, eight dilutions). Control wells containing only bacteria and broth (positive control) and bacteria with bleach (negative control) were also prepared. Plates were incubated at 37 °C for 24 h for bac-

teria and at 25 °C for *C. albicans*. Visible growth (MIC) was determined. The MIC was determined as the minimum concentration at which no growth of the microorganism was visually observed. Then, 10 µL of each well in which bacterial growth was inhibited was plated on the corresponding agar: TBX for *E. coli*, MLA for *L. monocytogenes*, BP for *S. aureus*, nutrient agar for *St. mutans* and *Ps. aeruginosa* and MEA for *C. albicans*, and incubated overnight at 37 °C or 25 °C to record the CMB. The minimum bactericidal concentration was determined as the minimum concentration of honey at which microorganisms did not grow on the agar plates after 24 h at 37 °C/25 °C.

2.9. Statistical Analysis

All analyses were performed in triplicate, expressing the results as mean values and standard deviations. A normality test was performed for all parameters. Parametric results were tested using multiple range tests with the LSD test ($p < 0.05$), while non-parametric values were assessed using the Kruskal–Wallis test and box-and-whisker plots. Principal component analysis (PCA) and Pearson correlations were applied to the results. Statgraphics Centurion XVIII statistical software (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, VA, USA) was used.

3. Results and Discussion

3.1. Total Phenolics and Total Flavonoids

Total phenolics in raw honey samples ranged between 24 and 242 mg GA/100 g. In methanolic extracts, the variation was between 4.9 and 25 mg GA/100 g. After in vitro digestion, the values ranged between 108 and 211 mg GA/100 g (Figure 1A). Both in raw honeys, extracts and digests, the highest content of total phenolics was obtained in heather honeys, followed by broom honeys and the lowest content was found in viper's bugloss honeys. The values of the raw honeys were higher than the results provided by literature, where values between 12 and 140 mg GA/100 g were obtained in honeys from different botanical and geographical origins [31–33]. Similar to our values were those described by Jara-Palacios et al. [34] in Spanish oak honeydew honeys (50.04–243.86 mg GA/100 g). The results obtained in this work for methanolic extracts were lower than those obtained by Almeida da Silva et al. [35] in samples from the Amazon of Northern Brazil, with a total phenolics content ranging from 17 to 66 mg GA/g extract. The lower values of total phenolics found in MEs in comparison with raw honeys were expected, because the Folin–Ciocalteu method also quantifies other reducing compounds apart from phenolics [36]. In all honeys, the phenolic compounds significantly increased after in vitro digestion, except in the three honeys with the highest phenolic content (M8, M9 and M12), in which after the digestion process, the total phenolics decreased. The blank digestion value was considered in the calculations to remove the interactions that the Folin–Ciocalteu reagent could have with the enzymes used in the digestion. However, the likely interaction of sugars and the Folin–Ciocalteu reagent were not eliminated, which could be the reason for the increase of this result. While Cianciosi et al. [11] showed a six-fold decrease in the amount of total phenolics from raw honey to honey after in vitro digestion and Rodriguez Romero [37] showed a decrease in different phenolic compounds after digestion, Seraglio et al. [3] observed no differences after gastric digestion, but a decrease in total phenolics after duodenal digestion. In the study completed by O'Sullivan et al. [13], there was no significant change in phenolic compounds after in vitro digestion, and in some honeys, they slightly increased, as it occurred in our study. The effect of an in vitro digestion on the phenolic content of a food varies depending on several factors, such as the food matrix and digestion conditions. Therefore, differences between studies are likely to be found [3]. The different results obtained in this study in comparison with those of other published papers would be likely due to the fact that some phenolic compounds could be more sensitive than others to pH changes [11] and to the different phenolic composition of several honeys. Most research was conducted on Manuka honeys, with there being only one study regarding honeydew honeys. Another possible reason for the different results could be the wide

variety of concentrations used during digestion in the different works or because in our study, the simulation of the oral phase was carried out, in contrast to other studies.

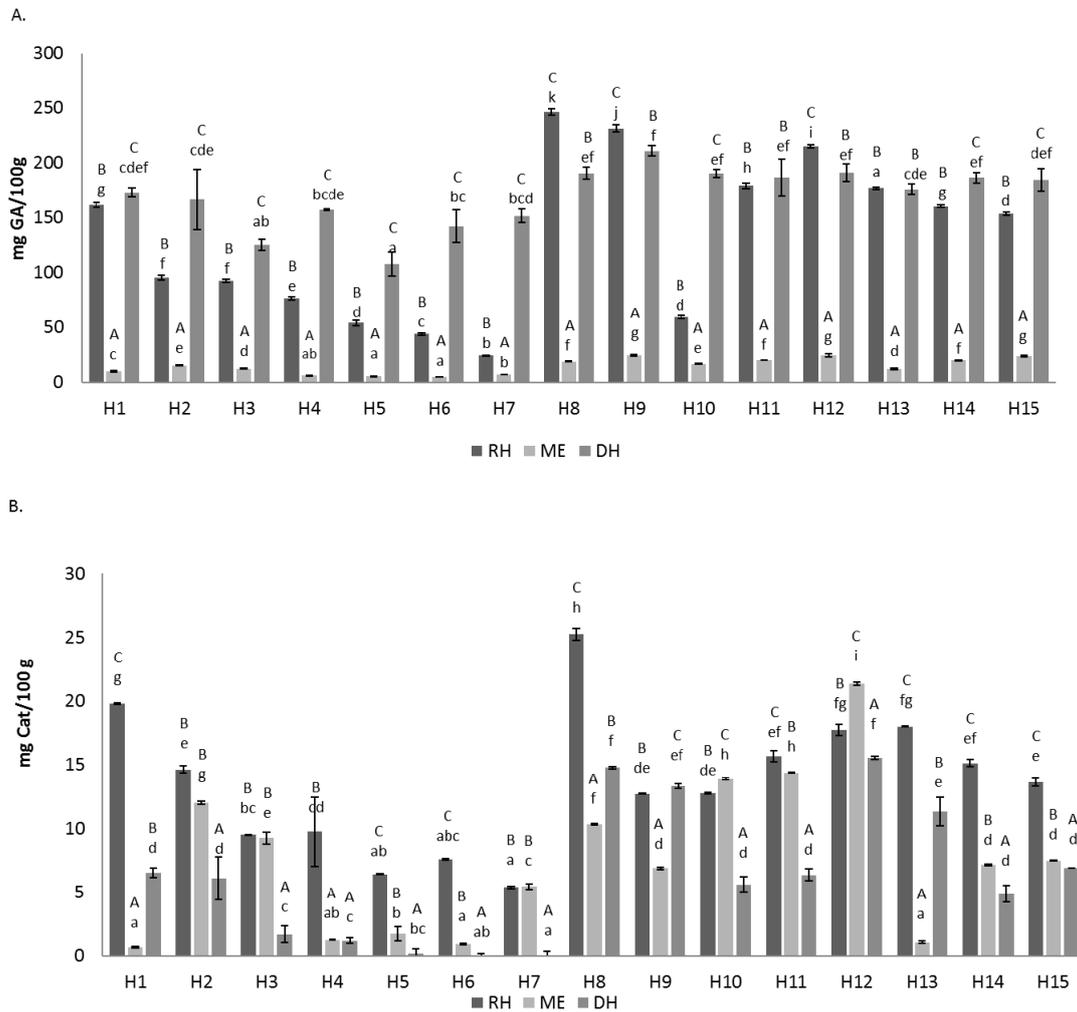


Figure 1. Total phenols (A) expressed as mg of gallic acid/100 g of honey and total flavonoids, and (B) expressed as mg of catechin/100 g of honey of raw honeys (RH), methanolic extracts (ME) and digestive extract (DH). Error bars represent the standard deviation for each data point. Different capitals letters (A–C) indicate significant differences ($p < 0.05$) between extractions comparing the same sample. Different lowercase letters (a–g) indicate significant differences ($p < 0.05$) between samples with the same extraction.

Regarding total flavonoids, the honeys with the highest values both raw and regarding methanolic extracts and in vitro digestion were heather honeys. Conversely, viper’s bugloss honeys exhibited the lowest values for total flavonoids. The ranges of variation in raw honeys were between 5.4 and 25 mg Cat/100 g, in methanolic extracts between 0.93 and 21 mg Cat/100 g and in in vitro digestions between 0 and 16 mg Cat/100 g (Figure 1B).

A significantly higher flavonoids content was obtained in the raw honey samples than in the methanolic extracts in most honeys, corroborating that honeys’ flavonoids must be measured on alcoholic extracts to remove interferences [27]. Only ME10 and ME12 showed higher values than their correspondent RH, probably because the result depends on the specific flavonoid composition of each sample. The total flavonoids’ content was higher than the data described by Osés et al. [9] in extracts of strawberry tree honeys (2.2–6.8 mg Cat/100 g). After the digestion process, the values of total flavonoids were lower than those of raw honeys in all honeys except in DH 9, where flavonoids slightly increased from

12.71 to 13.33 mg Cat/100 g of honey. Cianciosi et al. [11] showed a very drastic decrease (eight-fold) of flavonoids after digestion, obtaining 6.49 mg Cat/kg honey.

Although there is an increase in the amount of total phenolic compounds after *in vitro* digestion, there is a decrease in flavonoids, which might be related to the fact that the Folin–Ciocalteu method is not specific for phenolic compounds, but measures different reducing substances (sugars, proteins), whereas the procedure described for flavonoids is more specific for flavonoids such as rutin, luteolin and catechins, although it can also measure some phenolic acids [26].

3.2. Antioxidant Activities

The antioxidant properties of the raw honey samples, extracts and digests were evaluated against different radicals (Figure 2).

The activity against the ABTS^{•+} radical ranged between 79.08 and 525.01 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g honey}$. These values were higher than those reported for Slovakian honeys, with values ranging from 180 to 1110 $\mu\text{mol TE}/\text{kg}$ and for Cuban honeys, whose results ranged from 210 to 2940 $\mu\text{mol TE}/\text{kg}$ [38].

As with the results of total phenolic contents, antioxidant activities were higher in raw honeys and digests than in methanolic extracts. Conversely to the results of other researchers [3,11,13] who reported lower DPPH, FRAP or TEAC activities after digestion, our results showed that the measured antioxidant activities increased in honey digests. However, in other food matrices, an increase in the antioxidant activity of the sample after digestion was claimed to be due to the release of antioxidant compounds from the enzymatic digestion [39]. As for phenolic, different results in our study could be due to the inclusion of the simulation of the oral phase, which was not performed in other studies. It is worth emphasizing the high deviation of the antioxidant activities obtained in honeys after *in vitro* digestion so that in some cases, no significant differences ($p > 0.05$) were found regarding the results in raw and *in vitro* digested honeys. The greatest increase in antioxidant capacity after digestion occurred against the hydroxyl radical (AOA), and the smallest increase occurred against the ABTS radical, against which only five of the samples showed greater activity after *in vitro* digestion. We did not find significant differences among the different honey origins, except to indicate that in general, the results were lower in the viper's bugloss honeys (both in crude, extract and digestion), and the results were higher in the honeydew and heather honeys.

A significant correlation was observed between total ABTS, ORAC and AOA and total phenolic content ($r = 0.7287$; $r = 0.7754$; $r = 0.4852$; $p < 0.05$) assessing all the honey samples and the three different extractions ($n = 135$).

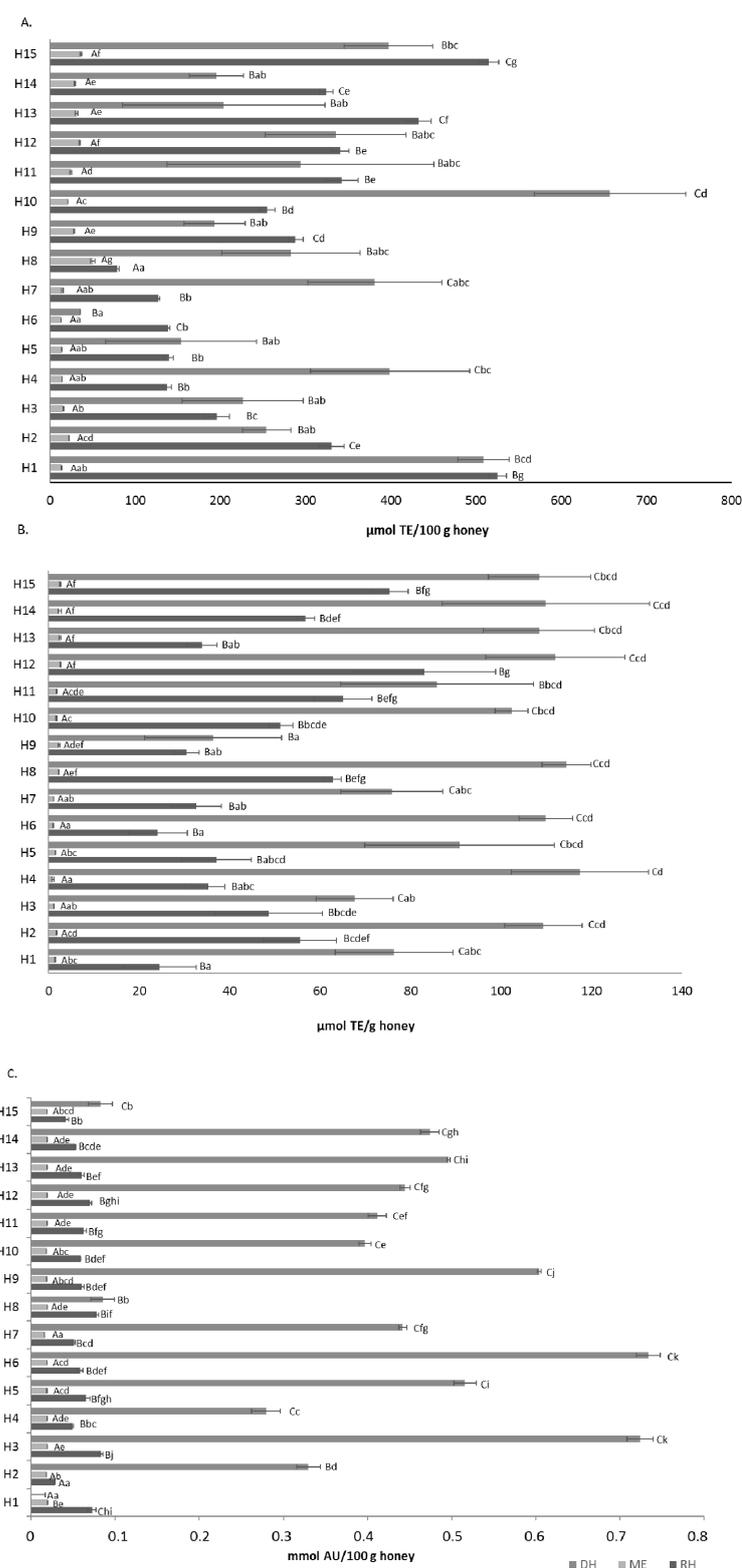


Figure 2. Antioxidant activity of raw honeys (RH), methanolic extracts (ME) and digestive extract (DH) against different radicals (ABTS^{•+} (A), ROO[•] (B) and •OH (C)). Error bars represent the standard deviation for each data point. Different capitals letters (A–C) indicate significant differences ($p < 0.05$) between extractions comparing the same sample. Different lowercase letters (a–g) indicate significant differences ($p < 0.05$) between samples with the same extraction.

3.3. Anti-Inflammatory Activity

In the raw honeys studied, the hyaluronidase inhibitory activity varied between 12 and 85% for a honey concentration of 750 mg/mL. In the extracts, inhibition rates varied between 27 and 83%. After digestion, inhibition of hyaluronidase fluctuated between 0 and 42% (Figure 3). Literature also showed that the values of anti-inflammatory activity were highly variable depending on the concentration of honey and phenolic compounds [9]. In this case, we observed a similar inhibition trend between the raw honey and the extracts, with a considerably reduced anti-inflammatory activity in the soluble fraction obtained after *in vitro* digestion, which might be due to the decrease in the compounds responsible for this activity during the honey-digestion process.

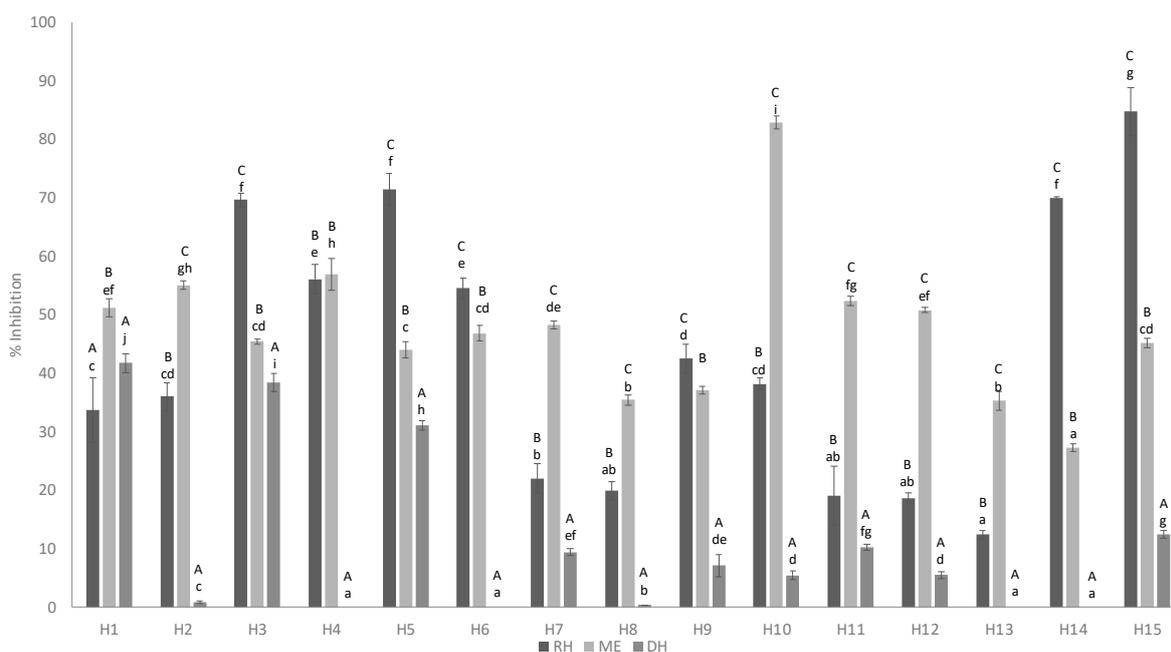


Figure 3. Anti-inflammatory activity of raw honeys (RH), methanolic extracts (ME) and digestive extract (DH). Error bars represent the standard deviation for each data point. Different capitals letters (A–C) indicate significant differences ($p < 0.05$) between extractions comparing the same sample. Different lowercase letters (a–g) indicate significant differences ($p < 0.05$) between samples with the same extraction.

3.4. Antimicrobial Activity

Results of the antimicrobial activity showed that all honeys exhibited antimicrobial activity against the six microorganisms evaluated. In Table 2, antimicrobial activity data were expressed as % honey, extract or digestive fraction, with the corresponding honey concentration (g/100 mL) in brackets for a better comparison of results.

S. aureus was the most sensitive microorganism to the 15 honeys analyzed, obtaining MICs between 4.69 and 9.38%. The yeast *C. albicans* was the most resistant, against which only honey 14 showed a bactericidal (MBC) effect at a concentration of 45%, although all the honeys showed inhibitory activity (MIC = 37.5%). Honey 2 (honeydew) exhibited the lowest inhibitory effect against all microorganisms. The MIC and MBC data of the different honeys coincided except for *L. monocytogenes* and *C. albicans*, whose MBC were higher concentrations than MIC.

Table 2. Cont.

		<i>C. albicans</i>														
		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15
RH	MIC	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)	37.5 (37.5)
	MBC	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	>45 (>45)	45 (>45)
ME	MIC	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)
	MBC	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)	15 (75)
DH	MIC	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)
	MBC	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)
		<i>Ps. aeruginosa</i>														
		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15
RH	MIC	9.38 (9.38)	37.5 (37.5)	9.38 (9.38)												
	MBC	9.38 (9.38)	37.5 (37.5)	9.38 (9.38)												
ME	MIC	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)
	MBC	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)	5 (25)
DH	MIC	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)
	MBC	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)	>90 (>7)

The MIC and MBC data obtained against *S. aureus* were comparable to the values obtained by Osés et al. [40]. This study also concluded that honeys with similar botanical origins showed different antimicrobial activities, i.e., no relationship between botanical origin and the inhibitory effect of the honeys against each of the microorganisms could be observed.

Regarding the antimicrobial activity of the methanolic extracts, *L. monocytogenes* was the most sensitive microorganism, while *St. mutans* together with *C. albicans* were the most resistant. The MIC and MBC obtained were extract concentrations between <1 to 15%, corresponding to <5 to 75 g/100 mL. Therefore, for all the microorganisms evaluated, except for *L. monocytogenes*, the MIC was higher in the ME than in RH, and therefore a lower antimicrobial activity was obtained for the extracts in comparison with raw honeys. With regard to *L. monocytogenes*, methanolic extracts showed a greater antimicrobial effect than raw honeys, which could be due to the fact that this microorganism was more sensitive to the phenolic compounds extracted, while the rest of the microorganisms were more sensitive to non-phenolic compounds that are present in raw honey. Previous studies demonstrated the antimicrobial activity of phenolic acids (coumaric, ferulic and syringic) against *L. monocytogenes* [41]. Malheiro et al. [42] also demonstrated that cinnamic acid and cinnamaldehyde and their derivatives significantly inhibit the growth of bacteria such as *E. coli* and *S. aureus*.

Regarding the soluble fraction obtained after in vitro digestion, we observed that it only exhibited antimicrobial activity against *S. aureus* and *L. monocytogenes*, showing MICs between <5 to 40% (0.39–3.13 mg/100 mL) for *S. aureus* and between 40 and >90% (3.13–>7 mg/100 mL) for *L. monocytogenes*. Higher concentrations of these extracts could not be evaluated because in the soluble fraction obtained after digestion, the honey concentration was already 7.82%. The MICs obtained against these two microorganisms were lower than the MICs obtained for the corresponding crude honeys, which could be partly due to the enzymes added during the in vitro digestion, because the digestion blank also showed some inhibition for both microorganisms (60% digestion fraction). However, the samples exhibited a lower MIC (and therefore higher antimicrobial activity) than the blank, so that the antimicrobial activity against *S. aureus* and *L. monocytogenes* exhibited by the soluble fraction obtained after in vitro digestion of honeys is likewise a fact. Mannina et al. [15]

reported no antimicrobial activity against *S. aureus* after Manuka honey gastric digestion and a low reduction in the antistaphylococcal activity after gastroduodenal digestion when compared with the undigested sample. Antimicrobial activity of the fraction obtained after digestion was also studied in other foodstuffs obtaining different results. In coffee pulp aqueous extract, antimicrobial activity against *E. coli* and *S. aureus* after in vitro digestion decreased, suggesting that bioactive compounds might degrade during in vitro digestion, there being also a structural disruption conducted by both the digestive enzymes and the low pH in the digestive system. Khochapong et al. [43] and López-Nicolas et al. [44] also obtained a decrease of approximately 10% of antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus* with fruit juices after in vitro digestion. However, Piscopo et al. [45] obtained an increase of the antimicrobial activity of *Feijoa sellowiana* with Bert. fruit extract, after in vitro gastrointestinal digestion.

3.5. Principal Components Analysis (PCA)

In order to study the influence of both chemical and digestion procedures on the results, phenols, flavonoids, antioxidant and anti-inflammatory activities were analyzed by PCA. The first two components described the 78.9% variance (Figure 4). PC1 included the information about total phenols and antioxidant activity against ROO^\bullet , while PC2 was defined by flavonoids. Samples with similar scores were positioned closely together. PCA divided the samples into three groups. RH were in the middle (group I), with a higher flavonoids content than the DH and ME. ME were in the left side of Figure 4 (group II), showing a higher anti-inflammatory activity and lower phenols' contents and antioxidant activities. DH were in the right side (group III) showing higher total phenols contents and higher antioxidant capacities. The fact that ME and DH were on opposite positions is logical, because total phenols actually comprise all reducing compounds, some of which are not extracted with methanol. Conversely, some hydrolysis procedures including in the digestion increase reducing substances that are quantified as total phenols. As expected, there were correlations among the reducing compounds evaluated by Folin–Ciocalteu and the antioxidant activities. However, the anti-inflammatory activity was not related to any of these compounds.

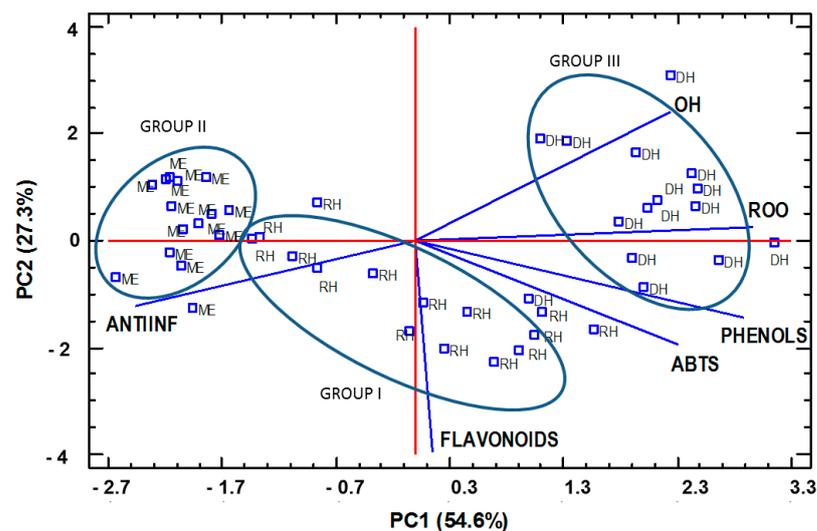


Figure 4. Principal components analysis derivate from phenols compositions, antioxidant and anti-inflammatory activity of RH, ME and DH.

4. Conclusions

Heather honeys showed the highest contents for bioactive compounds and higher potentially functional activities than other honeys. In contrast, viper bugloss samples

showed the lowest bioactive compounds' quantities and potentially functional activities regarding raw honeys, methanolic extracts and digests.

In general, honeys' methanolic extracts showed lower total phenols and flavonoids, lower antioxidant and antimicrobial activities and higher anti-inflammatory activity than raw honeys. However, soluble fraction after in vitro digestion showed higher total phenolics and antioxidant activities and lower anti-inflammatory activity. These results suggest that some bioactive compounds of honey are resistant to the action of digestive enzymes or might be released during in vitro digestion, increasing the antioxidant and antimicrobial properties, whereas other compounds, such as flavonoids, could be degraded, so that other biological properties, such as anti-inflammatory activity, could decrease.

This study is the first where the oral phase in digestion of honey has been simulated. Observed differences between our study and previous research could highlight the necessity of including the oral phase in further in vitro digestion studies.

Our work confirms that, after in vitro gastrointestinal digestion, honey still keeps compounds with antioxidant and antimicrobial activity against *L. monocytogenes* and *S. aureus*.

Methanolic extracts obtained from honey can be useful for cosmetics and pharmaceuticals due to their anti-inflammatory activity. Digested honey still possesses important biological properties and can act as an antioxidant and antimicrobial in the human body.

Author Contributions: Conceptualization, S.M.O., M.T.S. and M.A.F.-M.; methodology, M.A., S.M.O., M.T.S. and M.A.F.-M.; software, M.A. and S.M.O.; validation, M.A., L.C. and S.R.; formal analysis, M.A., L.C. and S.R.; investigation, S.M.O., M.A., L.C., S.R., M.T.S. and M.A.F.-M.; resources, S.M.O.; data curation, M.A. and S.M.O.; writing—original draft preparation, M.A. and S.M.O.; writing—review and editing, M.A.F.-M. and M.T.S.; visualization, M.A.F.-M.; supervision, S.M.O. and M.A.F.-M.; project administration, S.M.O. and M.T.S.; funding acquisition, M.T.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Leire Cantero gratefully acknowledges Junta de Castilla y León (Spain) for the research assistant contract (Grant No. UBU-09-A).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding authors.

Acknowledgments: Authors thank Alberto Colina for providing the honey samples for this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Vela, L.; De Lorenzo, C.; Pérez, R.A. Antioxidant capacity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and other physicochemical properties. *J. Sci. Food Agric.* **2007**, *87*, 1069–1075. [[CrossRef](#)]
2. Bogdanov, S. Honey composition. In *The Honey Book*; Science and Education: Kokand, Uzbekistan, 2011; Chapter 5, pp. 1–10.
3. Seraglio, S.K.T.; Vales, A.C.; Daguier, H.; Bergamo, G.; Azevedo, M.S.; Nehring, P.; Gonzaga, L.V.; Fett, R.; Costa, A.C.O. Effect of in vitro Gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds, minerals, and antioxidant capacity of *Mimosa scabrella* benth Honeydew honeys. *Food Res. Int.* **2017**, *99*, 670–678. [[CrossRef](#)]
4. Bueno-Costa, F.M.; Zambiasi, R.C.; Bohmer, B.W.; Chaves, F.C.; da Silva, W.P.; Zanusso, J.T.; Dutra, I. Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *LWT* **2016**, *65*, 333–340. [[CrossRef](#)]
5. Kassim, M.; Yusoff, K.M.; Ong, G.; Sekaran, S.; Yusof, M.Y.B.M.; Mansor, M. Gelam honey inhibits lipopolysaccharide-induced endotoxemia in rats through the induction of heme oxygenase-1 and the inhibition of cy-tokines, nitric oxide, and high-mobility group protein B1. *Fitoterapia* **2012**, *83*, 1054–1059. [[CrossRef](#)]
6. Gheldof, N.; Xiao-Hong, W.; Engeseth, N.J. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5870–5877. [[CrossRef](#)]
7. Kaškonienė, V.; Venskutonis, P.R. Floral Markers in Honey of Various Botanical and Geographic Origins: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2010**, *9*, 620–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Navarrete, P.; Eileen, S. Caracterización Fisicoquímica, Determinación de la Capacidad Antioxidante y Capacidad Antimicrobiana de la Miel Monofloral de Nabo. Bachelor's Thesis, Universidad de las Américas, Quito, Ecuador, 2018.
9. Osés, S.M.; Nieto, S.; Rodrigo, S.; Pérez, S.; Rojo, S.; Sancho, M.T.; Fernández-Muñío, M. Ángel Authentication of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honeys from southern Europe based on compositional parameters and biological activities. *Food Biosci.* **2020**, *38*, 100768. [[CrossRef](#)]

10. Wootton-Beard, P.C.; Moran, A.; Ryan, L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and FolinCiocalteu methods. *Food Biosci.* **2011**, *44*, 217–224.
11. Cianciosi, D.; Forbes-Hernández, T.Y.; Afrin, S.; Gasparrini, M.; Quiles, J.L.; Gil, E.; Bompadre, S.; Simal-Gandara, J.; Battino, M.; Giampieri, F. The Influence of In Vitro Gastrointestinal Digestion on the Anticancer Activity of Manuka Honey. *Antioxidants* **2020**, *9*, 64. [[CrossRef](#)]
12. Daglia, M.; Ferrari, D.; Collina, S.; Curti, V. Influence of in vitro simulated gastroduodenal digestion on methylglyoxal concentration of Manuka (*Lectospermum scoparium*) honey. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2140–2145. [[CrossRef](#)]
13. O’Sullivan, A.M.; O’Callaghan, Y.C.; O’Connor, T.P.; O’Brien, N.M. Comparison of the Antioxidant Activity of Commercial Honeys, Before and After In-Vitro Digestion. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2013**, *63*, 167–171. [[CrossRef](#)]
14. Parkar, S.G.; Jobsis, C.M.; Herath, T.D.; Stoklosinski, H.M.; van Klink, J.W.; Sansom, C.E.; Sims, I.M.; Hedderley, D. Metabolic and microbial responses to the complexation of manuka honey with α -cyclodextrin after simulated gastrointestinal digestion and fermentation. *J. Funct. Foods* **2017**, *31*, 266–273. [[CrossRef](#)]
15. Mannina, L.; Sobolev, A.P.; Coppo, E.; Di Lorenzo, A.; Nabavi, S.M.; Marchese, A.; Daglia, M. Antistaphylococcal activity and metabolite profiling of manuka honey (*Leptospermum scoparium* L.) after in vitro simulated digestion. *Food Funct.* **2016**, *7*, 1664–1670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Seraglio, S.K.T.; Schulz, M.; Gonzaga, L.V.; Fett, R.; Oliveira Costa, A.C. Current status of the gastrointestinal digestion effects on honey: A comprehensive review. *Food Chem.* **2021**, *357*, 129807. [[CrossRef](#)]
17. Louveaux, J.; Maurizio, A.; Vorwohl, G. International commission for bee botany of IUBS. Methods of Melissopalynology. *Bee World* **1978**, *59*, 139–157. [[CrossRef](#)]
18. Terradillos, L.A.; Muniategui, S.; Sancho, M.T.; Huidobro, J.F.; Simal-Lozano, J. An alternative method for analysis of honey sediment. *Bee Sci.* **1994**, *3*, 86–93.
19. Von der Ohe, W.; Persano, O.L.; Piana, M.L.; Morlot, M.; Martin, P. Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie* **2004**, *35*, 18–25. [[CrossRef](#)]
20. Marcazzan, G.L.; Mucignat-Caretta, C.; Marchese, C.M.; Piana, M.L. A review of methods for honey sensory analysis. *J. Apic. Res.* **2017**, *57*, 75–87. [[CrossRef](#)]
21. Piana, M.L.; Oddo, L.P.; Bentabol, A.; Bruneau, E.; Bogdanov, S.; Declerck, C.G. Sensory analysis applied to honey: State of the art. *Apidologie* **2004**, *35*, S26–S37. [[CrossRef](#)]
22. Baltrušaitytė, V.; Venskutonis, P.R.; Čeksterytė, V. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chem.* **2007**, *101*, 502–514. [[CrossRef](#)]
23. Pastoriza, S.; Delgado-Andrade, C.; Haro, A.; Rufián-Henares, J. A physiologic approach to test the global antioxidant response of foods. The GAR method. *Food Chem.* **2011**, *129*, 1926–1932. [[CrossRef](#)]
24. Rufián-Henares, J.A.; Delgado-Andrade, C. Effect of digestive process on Maillard reaction indexes and antioxidant properties of breakfast cereals. *Food Res. Int.* **2009**, *42*, 394–400. [[CrossRef](#)]
25. Meda, A.; Lamien, C.E.; Romito, M.; Millogo, J.; Nacoulma, O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem.* **2005**, *91*, 571–577. [[CrossRef](#)]
26. Pękal, A.; Pyszynska, K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal. Methods* **2014**, *7*, 1776–1782. [[CrossRef](#)]
27. Sancho, M.T.; Pascual-Mate, A.; Rodríguez-Morales, E.G.; Osés, S.M.; Escriche, I.; Periche, A.; Fernández-Muiño, M.A. Critical assessment of antioxidant-related parameters of honey. *J. Food Sci. Technol.* **2016**, *51*, 30–36. [[CrossRef](#)]
28. Koracevic, D.; Koracevic, G.; Djordjevic, V.; Andrejevic, S.; Cosic, V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J. Clin. Pathol.* **2001**, *54*, 356–361. [[CrossRef](#)]
29. Huang, D.; Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J.A.; Prior, R.L. Throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4437–4444. [[CrossRef](#)]
30. Ferreres, F.; Lopes, G.; Gil-Izquierdo, A.; Andrade, P.B.; Sousa, C.; Mouga, T.; Valentão, P. Phlorotannin Extracts from Fucales Characterized by HPLC-DAD-ESI-MSn: Approaches to Hyaluronidase Inhibitory Capacity and Antioxidant Properties. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 2766–2781. [[CrossRef](#)]
31. Ferreira, I.C.; Aires, E.; Barreira, J.C.; Estevinho, L.M. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chem.* **2009**, *114*, 1438–1443. [[CrossRef](#)]
32. Pita-Calvo, C.; Vázquez, M. Differences between honeydew and blossom honeys: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *59*, 79–87. [[CrossRef](#)]
33. Socha, R.; Juszczak, L.; Pietrzyk, S.; Fortuna, T. Antioxidant activity and phenolic composition of herb honeys. *Food Chem.* **2009**, *113*, 568–574. [[CrossRef](#)]
34. Jara-Palacios, M.J.; Ávila, F.J.; Escudero-Gilete, M.L.; Pajuelo, A.G.; Heredia, F.J.; Hernanz, D.; Terrab, A. Physicochemical properties, colour, chemical composition, and antioxidant activity of Spanish Quercus honeydew honeys. *Eur. Food Res. Technol.* **2019**, *245*, 2017–2026. [[CrossRef](#)]

35. Almeida da Silva, I.A.; Sarmiento da Silva, T.M.; Camara, C.A.; Queiroz, N.; Magnani, M.; Santos de Novais, J.; Bastos Soledade, L.E.; de Oliveira Lima, E.; de Souza, A.L.; Gouveia de Souza, A. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chem.* **2013**, *141*, 3552–3558. [[CrossRef](#)]
36. Petretto, G.L.; Cossu, M.; Alamanni, M.C. Phenolic content, antioxidant and physico-chemical properties of Sardinian mon-floral honeys. *Int. J. Agric. Food Chem.* **2015**, *50*, 482–491.
37. Rodriguez-Romero, B.A. Caracterización química y evaluación de las actividades antioxidantes y antimicrobiana de mieles florales. Naranjo, cactáceas y manzanilla. Ph.D. Thesis, Universidad Autónoma de Queretaro, Queretaro, Mexico, 2012.
38. Alvarez-Suarez, J.M.; Tulipani, S.; Díaz, D.; Estevez, Y.; Romandini, S.; Giampieri, F.; Damiani, E.; Astolfi, P.; Bompadre, S.; Battino, M. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 2490–2499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Carrillo, C.; Rey, R.; Hendrickx, M.; Cavia, M.D.M.; Alonso-Torre, S. Antioxidant Capacity of Beetroot: Traditional vs Novel Approaches. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2017**, *72*, 266–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Osés, S.M.; Pascual-Maté, A.; de la Fuente, D.; de Pablo, A.; Muiño, M.A.F.; Sancho, M. Comparison of methods to determine antibacterial activity of honeys against *Staphylococcus aureus*. *NJAS Wagening. J. Life Sci.* **2016**, *78*, 29–33. [[CrossRef](#)]
41. Miyague, L.; Macedo, R.E.; Meca, G.; Holley, R.A.; Luciano, F.B. Combination of phenolic acids and essential oils against *Listeria monocytogenes*. *LWT* **2015**, *64*, 333–336. [[CrossRef](#)]
42. Malheiro, J.F.; Maillard, J.; Borges, F.; Simoes, M. Evaluation of cinnamaldehyde and cinnamic acid derivatives in microbial growth control. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2018**, *141*, 71–78. [[CrossRef](#)]
43. Khochapong, W.; Ketnawa, S.; Ogawa, Y.; Punbusayakul, N. Effect of in vitro digestion on bioactive compounds, antioxidant and antimicrobial activities of coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extract. *Food Chem.* **2021**, *348*, 129094. [[CrossRef](#)]
44. López-Nicolás, R.; González-Bermúdez, C.A.; Ros-Berruazo, G.; Frontela-Saseta, C. Influence of in vitro gastrointestinal digestion of fruit juices enriched with pine bark extract on intestinal microflora. *Food Chem.* **2014**, *157*, 14–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Piscopo, M.; Tenore, G.C.; Notariale, R.; Maresca, V.; Maisto, M.; De Ruberto, F.; Heydari, M.; Sorbo, S.; Basile, A. Antimicrobial and antioxidant activity of proteins from *Feijoa sellowiana* Berg. fruit before and after in vitro gastrointestinal digestion. *Nat. Prod. Res.* **2020**, *34*, 2607–2611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]