



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Ciudad del Conocimiento Tulancingo Hidalgo
Instituto de Ciencias Agropecuarias



Maestría en Ciencias de los Alimentos

**Extracción con ultrasonido de compuestos bioactivos de
diferentes mieles con propiedades antioxidantes y
antidiabéticas**

TESIS

Que para obtener el título de:
Maestra en Ciencia de los Alimentos

PRESENTA

Ing. Diana Belem Garrido Islas

Dirección:

Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Co-Dirección:

M. en C. Uriel González Lemus

Asesores:

Dra. Elizabeth Pérez Soto

Dra. Alma Delia Hernández Fuentes

Dr. Armando Peláez Acero

Tulancingo Hidalgo, México 2022.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 Instituto de Ciencias Agropecuarias
Salud animal y humana, una Universidad para todos
 Maestría en Ciencia de los Alimentos

COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos
Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: "Extracción con ultrasonido de compuestos bioactivos de diferentes mieles con propiedades antioxidantes y antidiabéticas", que desarrolla la estudiante Diana Belem Garrido Islas

Asistentes:

- Dr. Rafael Germán Campos Montiel
- Mtro. Uriel González Lemus
- Dra. Alma Delia Hernández Fuentes
- Dra. Elizabeth Pérez Soro
- Dr. Armando Peláez Acero

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante, comunicando a la estudiante, Garrido Islas Diana Belem, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. La estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que la estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE
 "AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
 Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 19 de septiembre de 2022

- Dr. Rafael Germán Campos Montiel
- Mtro. Uriel González Lemus
- Dra. Alma Delia Hernández Fuentes
- Dr. Elizabeth Pérez Soto
- Dr. Armando Peláez Acero



Avenida Universidad Km. 1 s/n. Exhacienda Aquetzalpa
 Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México. C.P. 43600
 Teléfono +52 (771) 71 72000 ext: 2425
maestria_alimentos@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

Agradecimientos

Agradezco a Dios por darme la oportunidad de poder terminar un grado más en mis estudios, porque me sostuvo y me dio sabiduría para seguir hasta el final.

Agradezco por haberme otorgado una familia maravillosa, quienes han creído en mí siempre. Me han dado ejemplo de superación, humildad y sacrificio.

Agradezco a mis compañeros los cuales me apoyaron demasiado al maestro Lucio, al doctor a Uriel por todos sus consejos, y a mi director el doctor Campos.

“Dad gracias al señor, por que el es bueno por que para siempre es su misericordia.”

1 crónicas 16:34

Índice general

I.	Índice de figuras	1
II.	Resumen.....	2
III.	Abstract	3
1	Introducción	4
2	Marco teórico.....	5
2.1	La miel	5
2.2	Producción de la miel en México	6
2.3	Tipos de miel	8
2.4	Composición.....	9
2.4.1	Carbohidratos.....	9
2.4.2	Proteínas	9
2.4.3	Enzimas.....	9
2.4.4	Aminoácidos.....	10
2.4.5	Humedad.....	10
2.4.6	Minerales.....	10
2.4.7	Vitaminas.....	11
2.4.8	Color	12
2.5	Compuestos bioactivos	12
2.5.1	Compuestos fenólicos	12
2.5.2	Flavonoides	13
2.6	Actividades biológicas	14
2.6.1	Actividad antioxidante	14
2.6.2	Actividad antidiabética.....	15
2.7	Diabetes.....	16
2.8	Tipos de diabetes	16
2.8.1	Tipo 1.....	17
2.8.2	Tipo 2.....	18
2.8.3	Digestión de hidratos de carbono	19
2.8.4	α -Amilasa.....	21
2.8.5	α -Glucosidasa	21
2.8.6	Ultrasonido.....	22

3	Justificación	23
4	Planteamiento del problema	23
5	Objetivo general.....	24
6	Objetivos específicos.....	24
7	Hipótesis.....	25
8	Variables de estudio.....	25
9	Materiales y métodos	26
9.1	Etapa 1.....	26
9.2	Etapa 2.....	27
9.3	Fenoles totales.....	27
9.4	Flavonoides totales	27
9.5	Actividades antioxidantes	28
9.6	Actividad de eliminación de radicales libres ABTS.....	28
9.7	Actividad de eliminación de radicales libres DPPH	28
9.8	Azúcares reductores.....	29
9.9	Azúcares totales	29
9.10	Actividad antidiabética in vitro	29
9.10.1	Inhibición de α -glucosidasa.....	29
9.10.2	Inhibición de α -amilasa	30
10	Análisis estadístico	30
11	Resultados y Discusiones.....	31
11.1	Azúcares reductores.....	31
11.2	Fenoles	33
11.3	Flavonoides	33
11.4	Eliminación de los radicales libres ABTS Y DPPH.....	34
11.5	Inhibición de enzimas α -amilasa y α -glucosidasa	35
12	Conclusiones.....	37
13	Referencias.....	38

I. Índice de figuras

Tabla 1. Contenido de minerales de la miel.....	11
Tabla 2. Nomenclatura de las mieles.....	26
Tabla 3. Contenido de azúcares reductores de los extractos de miel.....	31
Figura 1. Participación por estado de la producción de miel 2019	6
Figura 2. Síntomas presentes en las personas con diabetes tipo 1	18
Figura 3. Contenido de azúcares en las distintas mieles y tiempos de ultrasonido	32
Figura 4: Efecto del ultrasonido a diferente tiempo (0, 10,20,30 min) en diferentes mieles en sus compuestos bioactivos	32
Figura 5. Efecto del ultrasonido a diferente tiempo (0, 10,20,30 min) en diferentes mieles en su capacidad antioxidante.....	34
Figura 6. Efecto del ultrasonido a diferente tiempo (0, 10,20,30 min) en diferentes mieles en su capacidad de inhibición	35

II. Resumen

La miel en México ha ocupado un lugar importante desde la antigüedad como endulzante y para combatir algunos padecimientos por sus actividades biológicas, antitumoral, antiinflamatorias, antibacterianas, antivirales y anti fúngica, pero se ha investigado poco sobre el uso de la miel en trastornos metabólicos como la diabetes mellitus (DM). Es una enfermedad metabólica que se clasifica como parte de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) las cuales se incrementan año con año, para la cual se han buscado alternativas de tratamiento que sean más naturales. Una de ellas es la inhibición de enzimas como la α -amilasa y α -glucosidasa las cuales ayudan a retardar la absorción de la glucosa a la sangre y así no tener un efecto hipoglucémico. El objetivo de la tesis fue extraer compuestos bioactivos de diferentes mieles multiflorales por ultrasonido y determinar el efecto inhibitor de estas enzimas relacionadas con la DM. Se realizaron extractos mediante ultrasonido en etanol al 85% a diferentes tiempos los (0, 10, 20 y 30 min) a una onda de frecuencia de 50-60 Hz, se determinaron fenoles, flavonoides capacidad antioxidante medida como ABTS y DPPH e inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa. Los resultados mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las mieles y los tiempos de extracción con ultrasonido. En el tiempo de 20 min de ultrasonido se tuvieron los mejores resultados. En promedio en los fenoles tuvieron un aumento de 24.9 ± 1.8 mg Eq Q/100 g, en flavonoides de 0.99 ± 0.033 mg Eq Q/100 g, y en la capacidad antioxidante por ABTS un incremento de 19.6 ± 1.06 mg Eq AG/100 mg y en DPPH de 21.5 ± 3.0 mg Eq AG/100 mg, inhibición de α -amilasa el aumento fue de $24.1 \pm 0.3\%$ e inhibición de α -glucosidasa de $16.7 \pm 0.3 \%$. Estos resultados indican que todas las mieles cuentan con propiedades antidiabéticas y son una alternativa más saludable a las personas con DM y que con ultrasonido se incrementa la extracción de estos compuestos bioactivos.

Palabras clave: Diabetes mellitus, compuestos bioactivos, miel.

III. Abstract

Honey in Mexico has held an important place since ancient times as a sweetener and to combat some ailments due to its biological, antitumor, anti-inflammatory, antibacterial, antiviral and antifungal activities, but little research has been done on the use of honey in metabolic disorders such as diabetes mellitus (DM). It is a metabolic disease that is classified as part of the non-communicable chronic diseases (ECNT) which are increasing year after year, for which more natural treatment alternatives have been sought. One of them is the inhibition of enzymes such as α -amylase and α -glucosidase, which help slow the absorption of glucose into the blood and thus do not have a hypoglycaemic effect. The objective of the thesis was to extract bioactive compounds from different multiflorales honeys by ultrasound and to determine the inhibitory effect of these enzymes related to DM. Extractions were made by ultrasound in 85% ethanol at different times (0, 10, 20 and 30 min) at a frequency wave of 50-60 Hz, phenols, flavonoids antioxidant capacity measured as ABTS and DPPH and inhibition of α -amylase and α -glucosidase. The results showed significant differences ($P < 0.05$) between the honeys and the ultrasound extraction times. The best results were obtained in the time of 20 min of ultrasound. On average, phenols had an increase of 24.9 ± 1.8 mg Eq Q/100 g, in flavonoids 0.99 ± 0.033 mg Eq Q/100 g, and in the antioxidant capacity by ABTS an increase of 19.6 ± 1.06 mg Eq AG/100 mg and in DPPH of 21.5 ± 3.0 mg Eq AG/100 mg, α -amylase inhibition increased by $24.1 \pm 0.3\%$ and α -glucosidase inhibition by $16.7 \pm 0.3\%$. These results indicate that all honeys have antidiabetic properties and are a healthier alternative for people with DM and that the extraction of these bioactive compounds is increased with ultrasound.

Key words: Diabetes mellitus, bioactive compounds, honey.

1 Introducción

La miel ha ocupado un lugar importante desde la antigüedad como endulzante y medicina tradicional, ha sido mencionada como medicamento en innumerables obras. Es una solución de azúcar viscosa y saturada que proviene del néctar que ha sido recolectado y modificado por la abeja (*Apis mellífera*) (Vandamme et al., 2013).

El interés de la investigación es principalmente por sus componentes como el azúcar (75-79%) y agua (20%), y algunos otros son proteínas, vitaminas del complejo B, minerales y antioxidantes como flavonoides, ácido ascórbico, catalasa y selenio (L.Vandamme, Heyneman, Hoeksema, Verbelen, Monstrey., 2013). Es utilizada por sus propiedades medicinales y funcionales, ya que es un alimento antioxidante que contiene una variedad de fenoles y flavonoides, contiene actividades biológicas como antitumoral, antiinflamatorias, antibacterianas, antivirales y antifúngicas, reduce la tos, también se ha investigado un poco sobre el uso puntual de la miel en trastornos metabólicos como la diabetes mellitus (Peiró, 2018).

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica que se ha clasificado como parte de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) (Villalobos et al. 2008). Esta tiende a incrementar año con año, y se ha convertido en un problema de salud para el cuál es necesario buscar alternativas de tratamiento (International Diabetes Federation., 2019).

2 Marco teórico

2.1 La miel

Conforme a la NOM Oficial Mexicana NOM-004-SAG/GAN-2018, la miel es la sustancia dulce natural producida por abejas a partir del néctar de las flores o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas y que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, y depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure o pueda añejarse.

De acuerdo a Cristian y Mariano (2016) la miel es una sustancia producida por las abejas (*Apis mellifera*) que recogen y procesan el néctar de las flores o de las secreciones de ciertas especies de plantas.

Está compuesta principalmente de fructosa y glucosa (65%), así como agua (18%), con un contenido mínimo de proteínas y lípidos y otros constituyentes como enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, carotenoides, vitaminas, sustancias aromáticas, también contiene minerales y metales pesados, que juegan un papel importante en la determinación de las cualidades de la misma (Silva et al., 2015).

Se tiene en cuenta que es un producto muy complejo el cual depende de la botánica de la flor, la cual se debe a la región geográfica, condiciones climatológicas, edad, etc. Por lo tanto, se tienen diferentes mieles dado a su origen geográfico de donde se obtienen (Solayman et al., 2015).

2.2 Producción de la miel en México

México es uno de los diez países productores de miel, ocupando el quinto lugar en producción en el mundo y el tercer exportador, en las ventas internacionales estando solo por debajo de China y Argentina. El 70 % de la producción proviene de Yucatán, Campeche, Jalisco y Chiapas con un registro de producción de nueve mil 810, siete mil 520, cinco mil 948 y cinco mil 500 toneladas de miel respectivamente de cada estado (SADER, 2019).

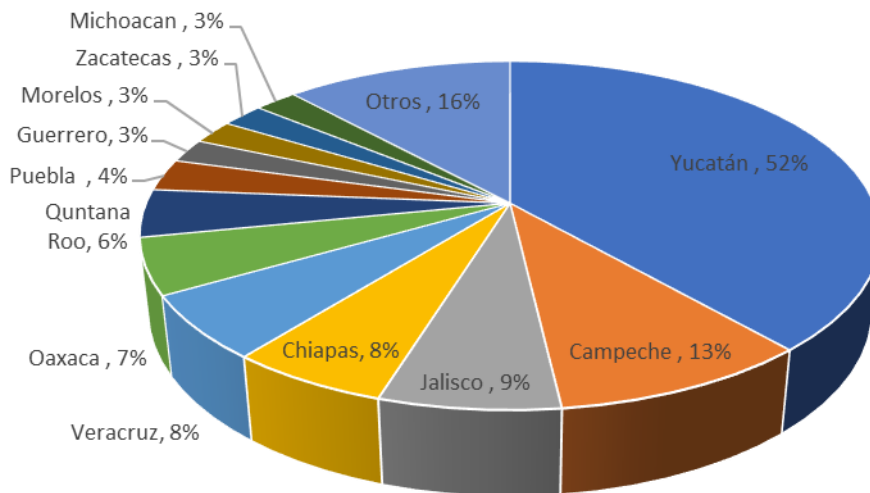


Figura 1. Participación por estado de la producción de miel 2019

Fuente: Elaborado con base a datos de SADER 2019

Conforme a estos datos la producción de miel fue de 61.9 mil toneladas, lo que represento un 6.1 % más que en los últimos diez años cuya medida fue de 58 mil toneladas. La producción de miel depende alrededor de 43 mil apicultores los cuales deben de contar con el adecuado manejo de la colonia, la genética de las abejas utilizadas para esta producción, las variantes climatológicas como heladas, huracanes, sequias, entre otros, esto también se ve reflejado en el color, olor y sabor de la miel (SAGARPA, 2019).

2.3 Tipos de miel

Existen alrededor de 320 variedades de miel que proceden de diversas fuentes florales por lo cual el sabor, color y olor de un tipo específico dependen de las diversas fuentes líquidas de las flores y plantas visitadas por la abeja melífera y esto depende de la temperatura, lluvia y cambios climáticos y estacionales de donde se encuentre la planta. El color varía de marrón claro a marrón oscuro dependiendo de dónde zumbaban las abejas (Meo et al., 2017).

La clasificación depende a la recolección de polen que realiza la abeja melífera ya sea de una flor o de diversas flores, para poder clasificar las mieles en monoflorales y las multiflorales.

Mieles monoflorales: se les denomina así cuando en su composición predomina una especie botánica con un porcentaje de polen superior o igual a 45% (Córdova et al. 2013) predominan en las zonas de áreas templadas de especies como brezo, tilo, trigo, trébol y en áreas tropicales de naranja, castaño, eucalipto, romero, a las cuales se les denomina según sea la planta (Solayman et al., 2015)

Mieles multiflorales: son aquellas que provienen de varias fuentes botánicas, y ninguna de las cuales es predominante (Buelga et al., 2017), cada tipo de polen con tiene un porcentaje menor al 45 % (Córdova et al., 2013).

2.4 Composición

2.4.1 Carbohidratos

Los principales hidratos de carbono que componen la miel son los monosacáridos fructosa 38%, glucosa 31%, de igual manera se han identificado diez disacáridos maltosa, sacarosa, maltulosa, turanosa, isomaltosa, laminaribiosa, nigerosa, cojibiosa, gentiobiosa y B-trehalosa y algunos trisacáridos como Maltotriose, Erllose, Melezitose, Centose 3- a 5 Isomaltosilglucosa, L-Kestosa, Isomaltotriosa, Panose, Psopanose y Theanderose, todos presentes en cantidades muy pequeñas (Khan et al., 2017).

2.4.2 Proteínas

La miel contiene un porcentaje muy bajo de proteínas aproximadamente 0.5% las cuales son principalmente enzimas y aminoácidos (Ulloa, 2010), y cuanto menor sea el nivel menor será la tensión superficial de la miel, produciéndose así una tendencia a la formación de espuma, las mieles adulteradas, sobrecalentadas o almacenadas durante mucho tiempo muestran una reducción o ausencia del contenido de proteínas (De-Melo et al., 2017).

Con diversos estudios se han identificado cerca de 8 a 11 proteínas y cuatro son comunes en todas las variedades de mieles. Estas se originan a partir de la abeja melífera y el lugar de donde se obtienen la sustancia alimenticia y estas se encuentran principalmente en forma de enzimas (Khan et al., 2017).

2.4.3 Enzimas

Las abejas melíferas agregan diferentes enzimas durante el proceso de maduración de la miel. Las enzimas agregadas incluyen diastasa (amilasa), que digiere el almidón a maltosa y es relativamente estable al calor y al almacenamiento, e invertasa (sacarasa o α -glucosidasa), que cataliza la conversión de sacarosa en

glucosa y fructosa. La invertasa también cataliza muchas otras conversiones de azúcar y es principalmente responsable de los patrones de azúcar de la miel.

La glucosa oxidasa y la catalasa son otras dos enzimas añadidas por las abejas melíferas, que regulan la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

El H₂O₂ producido sirven como uno de los factores antibacterianos de la miel, el rango contenido de proteínas en la miel es de 0,01 a 0,04 g (Khan et al., 2017).

2.4.4 Aminoácidos

Estos están presentes alrededor del 1% del peso de sus componentes de los cuales se han considerado tres posibles fuentes que pueden contribuir a la composición de aminoácidos en la miel los cuales son: néctar, polen y las propias abejas.

En la miel se han descrito un total de 26 aminoácidos libres, dentro de los cuales los más comunes son, serina, treonina, homoserina, taurina y α-. También se ha encontrado la presencia de ácido amino adípico en algunos tipos de miel. Dentro de los aminoácidos la prolina es la predominante, que representa entre el 50 y el 85% de esta fracción, seguida de la fenilalanina.

Como se encuentra en mayor cantidad la prolina se ha utilizado como criterio para la evaluación de la maduración de la miel y, en algunos casos, de la adulteración con azúcar (Buelga et al., 2017).

2.4.5 Humedad

Es la determinante más importante para la solidez, su alto contenido generalmente oscila entre el 13 y el 20% y de esto depende la viscosidad, también influye en el peso específico y color, condicionando así la conservación y cualidades organolépticas de este producto. Después de que se extrae de la colmena, su contenido de humedad puede cambiar dependiendo de las condiciones que se les dé durante el almacenamiento (Khan et al., 2017).

2.4.6 Minerales

El contenido de minerales tiene una gran influencia sobre el color, el sabor y la acidez (Yamul, 2008). Estos dependen de su origen botánico y geográfico donde se haya recolectado la miel se han encontrado 54 minerales diferentes (Solayman et al., 2016), algunos de ellos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. *Contenido de minerales de la miel*

Mineral	Promedio (ppm)	Rango (ppm)
Potasio	205	100–588
Azufre	58	036–108
Cloro	52	23–75
Calcio	49	23–68
Fósforo	35	23–50
Magnesio	19	11–56
Sodio	18	06–35
Hierro	2.4	1.2–4.8
Cobre	0.3	0,14–0,70
Manganeso	0.3	0,17–0,44

Fuente: Ball, 2007. La composición química de la miel

2.4.7 Vitaminas

En la miel contiene diversas vitaminas y compuestos bioactivos biológicos esenciales que incluyen vitaminas A (retinol), vitamina E (tocoferol), vitamina K (vitamina antihemorrágica), vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B6, niacina, vitamina C (Ácido ascórbico), Ácido pantoténico y fenólicos, flavonoides y ácidos grasos, ácido cinámico, ácido hidroxibenzoico, ácido octadecanoico, éster etílico y flavonoides. Además, contiene apigenina, pinocembrina, acetina, ácido abscísico.

La cantidad y presencia de estos compuestos está determinada por el clima y las condiciones geográficas de donde se obtuvo (Meo et al., 2017).

2.4.8 Color

Es uno de los principales atributos de la miel para poder comercializarla, existen diferentes colores que pueden variar desde tonos casi negros y ámbar, pero los más comunes son amarillo brillante, rojizo o verdoso, aunque este varía dependiendo de su origen botánico, contenido de ceniza, temperatura de la colmena y tiempo de almacenamiento.

Es un parámetro importante en la calidad, aceptación y preferencia de los consumidores y en diferentes países el precio está relacionado por este, los claros generalmente tienen un valor superior, aunque los tonos oscuros se aprecian en determinadas regiones (Silva et al., 2015).

2.5 Compuestos bioactivos

2.5.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un grupo químicamente heterogéneo, con aproximadamente 10,000 compuestos, que se agrupan en diferentes clases según su base estructura química. Se pueden dividir en ácido fenólico y flavonoides (flavonas, flavonoles, flavononas, flavonoides, antocianinas, isoflavonas). Los compuestos fenólicos son transferidos a través del néctar a la miel. Estos compuestos cuentan con un anillo aromático y con uno o más grupos hidroxilo en sus estructuras, que pueden variar de un simple a un polímero fenólico de molécula compleja de alto peso molecular (Silva et al., 2015).

La miel puede contener varios ácidos carboxílicos aromáticos y aril-alifáticos, principalmente hidroxilo y metoxi-derivados del ácido benzoico y cinámico y estas contribuyen a sus propiedades sensoriales, también se encuentra la presencia de benzoico, hidroxibenzoico, salicílico, gálico, vanílico, siríngico, protocatechico, también se han descritos ácidos férricos, cumarico, ferúlico, clorogénico, fenilacético y rosmarínico (Santos et al., 2017).

Se han realizado diferentes métodos (Folin-Ciocalteu) en las cuales se ha obtenido que el contenido fenólico total en la miel es de 20 a 193 mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 g de miel.

Estos compuestos fenólicos y algunos otros orgánicos su degradación en la miel depende de las condiciones ambientales a las que estén sometidos (Santos et al., 2017).

2.5.2 Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos estos contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante y una gran capacidad de protección frente a los fenómenos de daño oxidativo.

Tienen propiedades anti-radicales libres que se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica y en varias investigaciones se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y antiinflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (prevención de la placa de ateroma) (Martínez et al., 2002).

Santos Buelga (2017) describe que la cantidad de flavonoides de la miel es de 1,1 a 7,5 mg equivalentes de quercetina, de los cuales se encuentran diferentes clases de flavonoides, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavan-3-oles, antocianinas, dihidroflavonoles e isoflavonas, aunque en la miel se han identificado principalmente pinocembrina, crisina, galangina, pinobanksina, apigenina, genisteína, quercetina, kaempferol y miricetina (Santos, 2017).

2.6 Actividades biológicas

2.6.1 Actividad antioxidante

Los antioxidantes son agentes para contrarrestar el deterioro causado por oxidantes tales como O₂, OH⁻, radicales superóxidos y lípido peróxido. Algunas enfermedades crónicas y degenerativas como cáncer, síntesis de mutágenos, envejecimiento, aterosclerosis entre otras son persistentes y susceptibles al estrés oxidativo por lo cual las células exhiben un sistema de defensa contra el daño oxidativo (Ahmed et al., 2018).

Este sistema de defensa consta de radicales libres y agentes protectores oxidativos como catalasa, peroxidasa, ácido ascórbico, tocoferol y polifenoles, estos agentes antioxidantes estimulan biomoléculas como carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos por lo cual las células se alteran por esta estimulación y, en última instancia, provocan una respuesta antioxidante (Ahmed et al., 2018).

La miel exhibe una fuerte actividad antioxidante la cual contribuye a la prevención de varios trastornos agudos y crónicos como, inflamatorios, alérgicos, trombóticos, diabéticos, cardiovasculares, oncológicos entre otros (Figueroa, 2020)

Los ácidos fenólicos son responsables de la actividad antioxidante de la miel, aunque de igual manera intervienen azúcares, proteínas, aminoácidos, carotenos, ácidos orgánicos, productos de reacción de Maillard, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros componentes menores también contribuyen a la acción antioxidante (Ahmed et al., 2018).

Se estableció que la miel elevaba la cantidad y la actividad de agentes antioxidantes como el betacaroteno, la vitamina C, el glutatión reductasa y el ácido úrico en sujetos humanos sanos.

La forma de actuar de los antioxidantes es de secuestro de radicales, donación de hidrógeno, quelación de iones metálicos, acción del sustrato de los flavonoides para las acciones de los radicales hidroxilo y superóxido (Ahmed et al., 2018).

2.6.2 Actividad antidiabética

La diabetes tipo 2 consiste en hiperglucemia progresiva, resistencia a la insulina y β - insuficiencia de las células pancreáticas, que puede resultar de la toxicidad de la glucosa, citocinas inflamatorias y estrés oxidativo, y es responsable del 90-95% de todos los casos de diabetes (Canalejo, 2019). En este síndrome existen muchas anomalías del metabolismo de las lipoproteínas, los carbohidratos están involucradas con un nivel elevado de glucosa y las complicaciones agudas de este trastorno pueden incluir cetoacidosis hiperosmolar, diabética y estado hiperglucémico, que pueden conducir a la muerte (Brutsaert, 2020).

En estudios realizados in vivo se ha demostrado que la miel tiene componentes antidiabéticos y en estos están involucrados los antioxidantes en los cuales se encuentra un efecto hipoglucémico el cual se observó que redujo los niveles de glucosa en la diabetes mellitus tipo 2. Este antidiabético o hipoglucemiante de la miel se atribuye a la presencia de fructosa en ella ya que esta ayuda a regular el sistema de respuesta a la insulina, lo que resulta en un nivel de glucosa en sangre controlado (López, 2013).

Los monosacáridos como glucosa, fructosa y galactosa se forman por hidrólisis de carbohidratos antes de su absorción algunos estudios han sugerido que la fructosa es captada por los dos receptores GLUT5 y / o GLUT2 a través de proteínas

El nivel de la glucosa también puede ser regulado por el hipoglucemiante de la fructosa en el hígado, en esta área la fructosa estimula las enzimas de fosforilación, como la glucosidasa, lo que desencadena la fosforilación de la glucosa hepática, la inhibición de estas enzimas da como resultado la inhibición de la glucogenólisis. Por tanto, el metabolismo completo del glucógeno y la glucosa está regulado por la fructosa, lo que demuestra su función reguladora vital para controlar la hiperglucemia.

En un estudio realizado se observó que el efecto de la miel puede deberse a la modulación de la vía de señalización de la insulina ya que este es un componente clave. Es conocido por modular las funciones de varios sustratos que regulan la progresión del ciclo celular, la supervivencia celular y el crecimiento célula, el efecto de los extractos de miel sobre la vía de señalización de la insulina activada por Akta se ha investigado y se observó que el desarrollo de resistencia a la insulina se caracterizó por niveles elevados de NF- κ Fosforilación de serina B, MAPK y sustrato1 (Ahmed et al., 2018).

2.7 Diabetes

La diabetes mellitus, o simplemente llamada diabetes, es una enfermedad grave a largo plazo (o crónica) que se produce cuando hay niveles elevados de glucosa en la sangre de una persona ya que su cuerpo no puede producir la hormona insulina o la cantidad suficiente, o no puede utilizar eficazmente la insulina que produce (Reyes et al., 2009)

La insulina es una hormona esencial producida en el páncreas que permite que la glucosa del torrente sanguíneo ingrese a las células del cuerpo donde esa glucosa se convierte en energía, también es esencial para el metabolismo de proteínas y grasas. La falta de insulina, o la incapacidad de las células para responder a ella, conduce a niveles altos de glucosa en sangre (hiperglucemia), que es el indicador clínico de diabetes (Sáname et al., 2016).

El déficit de insulina, si no se controla a largo plazo, puede causar daño a muchos de los órganos del cuerpo, dando lugar a complicaciones de salud discapacitantes y potencialmente mortales como enfermedades cardiovasculares (ECV), daño a los nervios (neuropatía), daño renal (nefropatía) y enfermedad ocular (que provoca retinopatía, pérdida de la visión e incluso ceguera). Sin embargo, si se logra un control adecuado de la diabetes, estas complicaciones graves pueden retrasarse o prevenirse por completo (International Diabetes Federation, 2019).

2.8 Tipos de diabetes

2.8.1 Tipo 1

La diabetes tipo 1 es causada por una reacción autoinmune en la que el sistema inmunológico del cuerpo ataca las células beta del páncreas que producen insulina. Resultado de esto, el cuerpo produce muy poca o ninguna insulina (International Diabetes Federation, 2019).

Las causas de este proceso destructivo no se comprenden completamente, pero se sabe puede ser provocada por la combinación de susceptibilidad genética (conferida por una gran cantidad de genes) y un desencadenante ambiental, como una infección viral, inician la reacción autoinmune, también se han implicado toxinas o algunos factores dietéticos (International Diabetes Federation, 2019).

Esta enfermedad puede desarrollarse a cualquier edad, aunque el tipo 1 se presenta con mayor frecuencia en niños y jóvenes, esta es una de las enfermedades crónicas más comunes en la infancia, aunque la diabetes tipo 2 también se observa en niños mayores y va en aumento debido a que el sobrepeso y la obesidad infantil son cada vez más comunes (International Diabetes Federation, 2019).

Algunos de los principales síntomas presentados en la diabetes tipo 1 se muestran en la figura 1. Algunos de los síntomas como el cuadro clínico clásico de sed excesiva (polidipsia), micción frecuente (poliuria) y pérdida de peso puede no estar presente y el diagnóstico puede no darse a tiempo (International Diabetes Federation, 2019).



Figura 2. Síntomas presentes en las personas con diabetes tipo 1

Fuente: International Diabetes Federation, 2019

Las personas con diabetes tipo 1 necesitan inyecciones diarias de insulina para mantener un nivel de glucosa en el rango apropiado. Sin insulina, no sobrevivirían. Sin embargo, con un tratamiento diario apropiado con insulina, un control regular de la glucosa en sangre, educación y apoyo, pueden llevar una vida sana y retrasar o prevenir muchas de las complicaciones asociadas con la diabetes.

Los análisis para diagnosticar la diabetes tipo 1 son por una concentración elevada de glucosa en sangre o presencia de algunos o, raramente, de todos los síntomas mencionados en la figura 1. Sin embargo, diagnosticar el tipo de diabetes a veces es difícil y es posible que se requieran pruebas adicionales para distinguir entre diabetes tipo 1 y tipo 2 (International Diabetes Federation, 2019).

2.8.2 Tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 es un padecimiento crónico caracterizado por un trastorno del metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos, que se manifiesta principalmente como hiperglucemia, debida a la deficiencia relativa de insulina secundaria a un defecto de su secreción en las células β del páncreas, por aumento de la resistencia periférica al efecto de la hormona, o a la combinación de ambos

factores (García et., al 2011). Durante esta resistencia a la insulina, la hormona es ineficaz y a su debido tiempo provoca un aumento en la producción de insulina que, con el tiempo, puede desarrollarse una producción inadecuada de insulina y esto da como resultado la falla de las células beta pancreáticas para satisfacer la demanda (International Diabetes Federation, 2019).

Este tipo de diabetes se observa con mayor frecuencia en adultos mayores, pero en la actualidad se observado cada vez más en niños y adultos más jóvenes debido al aumento de los niveles de obesidad, inactividad física y una dieta inadecuada. La diabetes tipo 2 puede presentarse con síntomas similares a los de la diabetes tipo 1 pero, en general, pero la diabetes tipo 2 es mucho menos dramática y la condición puede ser completamente asintomático.

Las causas del tipo 2 no se comprenden completamente, pero existe un fuerte vínculo con el sobrepeso y la obesidad, y el aumento de la edad, así como con el origen étnico y los antecedentes familiares, por lo cual este tipo es más común. representa alrededor del 90% de toda la diabetes en todo el mundo (International Diabetes Federation, 2019). Y en México es uno de los principales problemas de salud pública. La prevalencia mundial para el año 2030 se ha estimado en 4.4%.³ Si en el tiempo actual la enfermedad afecta a 200 millones de personas en el mundo, esta cifra se elevará a 333 millones para el año 2025, alcanzando la mayor población de pacientes con diabetes jamás vista (más de 50%) en países en desarrollo (García et al., 2011).

2.8.3 Digestión de hidratos de carbono

El proceso de absorción de hidratos de carbono se divide en tres fases:

1. Fase luminal: Durante esta fase los carbohidratos, proteínas y grasas de la dieta son hidrolizados y solubilizados; dependiendo en gran medida de las secreciones pancreática y biliar.
2. Fase mucosa: En esta fase tiene lugar la hidrólisis final y la captación de los sacáridos y péptidos, y los lípidos captados por las células epiteliales son

procesados y almacenados para ser exportados desde el enterocito a los capilares linfáticos o sanguíneos.

3. Fase de transporte: En esta fase los nutrientes absorbidos pasan a la circulación sanguínea o linfática.

No todos los carbohidratos potencialmente digeribles se absorben en el intestino delgado, hasta el 20% del almidón de la dieta puede llegar al colon siendo fermentados por las bacterias del colon (al igual que ocurre con la fibra dietética fermentable), produciéndose ácidos grasos de cadena corta (butirato, propionato, acetato y lactato), hidrógeno, dióxido de carbono y metano (García et al., 2007).

Los hidratos de carbono (HC) son fundamentales en la alimentación humana. Su importancia radica en su valor energético, su poder edulcorante y su contenido en fibra. Son un amplio grupo de compuestos cuya característica química común es de polihidroxialdehídos, cetonas, alcoholes o ácidos, simples o polimerizados por uniones O-glucosídicas. Según el grado de polimerización se pueden catalogar en mono y disacáridos (azúcares), oligosacáridos y polisacáridos (Luna et al., 2014)

Durante la digestión de los carbohidratos participan numerosas enzimas gastrointestinales y pancreáticas, por ejemplo, las amilasas de origen salival y pancreático, que actúan sobre los oligosacáridos (almidones) para su fragmentación en disacáridos. Después, en el intestino, las enzimas α -dextrinas, maltasa, sacarasa y lactasa actúan sobre α -dextrinas, maltosa, sacarosa y lactosa respectivamente, descomponiéndolas en monosacáridos: glucosa, fructosa y galactosa que son transportados por las α -glucosidasa a las vellosidades del intestino delgado donde se lleva a cabo la absorción, este fenómeno es debido a la acción de las enzimas amilasa y maltasa, encargadas de la absorción de glucosa y la formación de glucógeno.

En estudios realizados se ha demostrado que la inhibición de enzimas clave (α -amilasa y α -glucosidasa) relevante para la DT2 podría servir como enfoque terapéutico para el manejo de esta enfermedad, y algunos compuestos bioactivos

vitales como los polifenoles que poseen interesantes beneficios estructura-función han mostrado potenciales prometedores (Alcalá et al., 2011).

La inhibición de estas enzimas disminuye significativamente la digestión y la absorción de carbohidratos, disminuyendo así el nivel de glucosa en sangre posprandial en los pacientes con diabetes mellitus.

Los hidratos de carbono se miden con el índice glucémico (GI) y durante investigaciones realizadas de la miel de Acacia se observaron que algunos tipos de miel tienen comparativamente mayor concentración de fructosa con GI inferior y Mieles de bajo GI son más valoradas en comparación con GI alto. La ingestión de miel con un GI tiene efectos ventajosos fisiológicos y puede ser utilizada en pacientes como un agente antidiabético (Peiró, 2019).

2.8.4 α -Amilasa

El nombre químico de la α -amilasa es α -1,4-D-glucano glucano hidrolasa; su clasificación numérica es EC 3.2.1.1, lo que la clasifica dentro del grupo de las enzimas hidrolasa. Esta proteína une al calcio con una simple cadena polipeptídica de 496 aminoácidos. Tiene múltiples funciones biológicas, ya que como enzima cumple un papel importante en la digestión inicial de almidón, el glucógeno y otros polisacáridos, porque cataliza la hidrólisis de los enlaces α -1,4-glucosídicos, lo cual resulta en la configuración α -anomérica de los oligosacáridos que liberan glucosa al medio ambiente oral (Tovar et al., 2013).

2.8.5 α -Glucosidasa

La α -glucosidasa (E.C. 3.2.1.20) se encuentra en el borde en cepillo de las mucosas del intestino delgado cataliza el paso final de la digestión del almidón y los disacáridos que son abundantes en la dieta humana (Kazeem et al., 2013).

Esta enzima se encuentra en todo lo largo de todo el intestino delgado. La absorción intestinal de los nutrientes tiene un efecto directo sobre la secreción de insulina, la hormona clave en el metabolismo de los carbohidratos. La secreción de insulina se

realiza de manera basal continua y en forma pulsátil o en bolos. Los sitios de acción de la insulina son los tejidos muscular, graso y hepático, donde la insulina actúa para permitir la entrada de glucosa a las células (Alcalá et al., 2011).

2.8.6 Ultrasonido

La extracción asistida por ultrasonido (EAU) se usa para aislar compuestos (Hussam et al., 2013). Ciertos beneficios en términos de penetración del disolvente surgen del uso en EAU de componentes de los alimentos, incluyendo la intensificación de transferencia de masa y efectos capilares. La extracción también podría mejorarse debido al colapso de las burbujas formadoras de cavitación, cerca de las paredes celulares (Toma et al., 2001). La tasa de extracción y el rendimiento pueden mejorarse mediante la combinación óptima de variables de ultrasonidos, como la intensidad y el tiempo (Rodríguez-Bernaldo et al., 2010). De igual manera es una tecnología de extracción amigable con el medio ambiente es el ultrasonido, esta metodología de extracción tiene como ventaja obtener mejores tiempos de proceso, mejora la calidad, reduce riesgos químicos y ocupa menos energía (Chemat et al., 2011).

3 Justificación

En la actualidad existe un interés por mejorar la salud y evitar las enfermedades crónicas como la diabetes, la miel contiene compuestos fenólicos y flavonoides que presentan una actividad antioxidante y antidiabética debido estos compuestos se relacionan con la inhibición de radicales libres y enzimas como la α amilasa y la β glucosidasa las cuales se relacionan con la actividad antidiabética, pero la miel por su alto contenido de azúcares no es recomendable para usar en personas con problemas de diabetes, por lo que en esta investigación se pretende extraer estos compuestos bioactivos antidiabéticos mediante el uso del ultrasonido para poder administrarlos a personas con problemas de diabetes.

4 Planteamiento del problema

La diabetes tipo II es una enfermedad crónica degenerativa que actualmente se ha incrementado en gran manera, las estadísticas actuales sobre el incremento consecutivo y la elevada tasa de mortalidad la han convertido en prioridad dentro del sistema de salud. El desarrollo de diabetes mellitus es el inicio de una atrofia lo cual conlleva el mal funcionamiento de diversos órganos relacionados, como el páncreas, riñón, hígado, alteraciones en la retina, alteraciones en lípidos, entre otros. Se han implementado diversas iniciativas de tratamiento desde la educación al paciente con riesgo o diagnóstico de diabetes, tratamiento farmacológico, ejercicio; sin embargo, la incidencia continúa en aumento con el paso de los años. Durante muchos años la cultura Mexicana ha utilizado la medicina tradicional como tratamiento de diversas enfermedades; tal es el caso de la miel la cual cuenta con actividades biológicas como antitumoral, antiinflamatorias, antibacterianas, antivirales, antifúngicas y se ha investigado un poco sobre el uso puntual de la miel en trastornos metabólicos como la diabetes mellitus ya que ha demostrado tener compuestos bioactivos con actividad antioxidante y antidiabética pero la miel no puede ser administrado a personas con diabetes por su alto contenido de azúcares

por lo que para poder administrar en personas diabéticas y se requiere extraer estos compuestos bioactivos de la miel mediante ultrasonido como una alternativa natural en la prevención y/o control de la diabetes tipo II.

5 Objetivo general

Extraer los compuestos bioactivos con la actividad antioxidante y antidiabética de mieles multiflorales mediante uso del ultrasonido

6 Objetivos específicos

- Extraer compuestos bioactivos con actividad antioxidante y antidiabética de distintas mieles mediante ultrasonido
- Cuantificar compuestos bioactivos (fenoles y flavonoides).
- Determinar la actividad antioxidante de las mieles mediante los métodos de ABTS y DPPH.
- Medir la actividad antidiabética mediante ensayos enzimáticos de α amilasa y la β glucosidasa.

7 Hipótesis

Los fenoles y flavonoides que contienen las mieles, obtenidos con ultrasonido, pueden inhibir la actividad enzimática de la α -amilasa y α -glucosidasa, lo que impide la hidrólisis de oligosacáridos y disacáridos absorbibles por los enterocitos del intestino delgado. Este efecto puede reducir los niveles de glucosas en la sangre efectuando un efecto hipoglucémico para las personas con diabetes tipo 2.

8 Variables de estudio

Variables de predicción: Las distintas mieles obtenidas de diferentes municipios del estado de Oaxaca y extracción por ultrasonido a distintos tiempos 0,10, 20 y 30 min.

Variables de respuesta: Compuestos bioactivos (fenoles y flavonoides), actividad antioxidante (ABTS y DPPH) y actividad antidiabética (α -amilasa y α -glucosidasa) con lo que cuentan los extractos obtenidos por ultrasonido.

9 Materiales y métodos

Las muestras evaluadas fueron un total de 6, las cuales fueron obtenidas de tres diferentes municipios del estado de Oaxaca las cuales fueron almacenadas en recipientes de 30 mL y codificadas con las iniciales del lugar donde se obtuvieron y el tipo de color de la miel cada una fue sellada herméticamente y almacenadas a una temperatura ambiente.

Tabla 2. *Nomenclatura de las mieles*

Municipio	Color	Código
San Jerónimo Tecoalt	Ámbar	J-A
San Jerónimo Tecoalt	Ámbar	J-A1
San Pablo Ocopetatillo	Ámbar	P-A
San Pablo Ocopetatillo	Blanca	P-B
San Pablo Ocopetatillo	Ámbar	P-A1
San Antonio Eloxochitlán	Blanca	A-B

Las muestras fueron llevadas a los laboratorios de Aprovechamiento Agroalimentario Integral y multiusos de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo en el Instituto de Ciencias Agropecuarias.

A estas mieles se le realizaron diferentes análisis, los cuales se describen a continuación.

9.1 Etapa 1

Se realizó la obtención de los extractos de las distintas mieles, de acuerdo a Pittaya Chaikham et al. 2015, con algunas modificaciones, se colocaron 5 g de miel en etanol al 85 % (1:10), posteriormente se introdujeron en baño ultrasónico por 10, 20 y 30 min con temperatura de 20 °C, se homogenizaron y centrifugaron a 6,000 rpm por 15 min a 4°C, el sobrenadante se guardó para los posteriores análisis.

9.2 Etapa 2

Se realizó la determinación de los compuestos bioactivos de los extractos obtenidos (fenoles, flavonoides, antioxidantes) de las mieles.

9.3 Fenoles totales.

Se realizaron de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu descrito por Rababah et al. (2013). Se realizó una dilución del extracto (1:10) usando agua destilada, se homogeneizaron y centrifugaron a 6,000 rpm por 15 min a 4 °C. Posteriormente, se tomaron 0.3 mL del sobrenadante en un tubo de ensayo y se mezclaron con 1.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu 0.2 N durante 8 min a temperatura ambiente y en oscuridad, posteriormente, se agregó 1.2 mL de Na₂CO₃ 0.7 M, y se dejaron en reposo durante dos horas en ausencia de luz. La mezcla resultante se midió a 765 nm usando un espectrofotómetro, frente a un blanco de agua. El contenido de fenoles totales se determinó a partir de una curva estándar de ácido gálico (0 a 100 mg/L). La cantidad de fenoles totales se expresó como equivalentes de ácido gálico (mg GAE/100 g de miel).

9.4 Flavonoides totales

El contenido total de flavonoides se determinó utilizando el método Dowd adaptado por Arvouet-Grand et al. (1994). Se utilizó una solución de cloruro de aluminio (AlCl₃) en metanol al 2%. Se colocó 5 mL el extracto con 5 mL de metanol puro, se homogenizo y se centrifugo a 6,000 rpm durante 15 min. En un tubo de ensayo se colocaron 2 mL del sobrenadante y se agregaron 2 mL de tricloruro de aluminio (AlCl₃) y se mantuvo en ausencia de luz durante 20 min, a las muestras se les midió la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro (Spectronic Genesys). Se utilizó quercetina para la elaboración de la curva de patrón (0 a 100 mg / L). El contenido total de flavonoides se expresó en mg equivalente de quercetina / 100 g de miel (mg QE / 100 g de miel).

9.5 Actividades antioxidantes

9.6 Actividad de eliminación de radicales libres ABTS

La actividad antioxidante se determinó utilizando el compuesto cromogénico ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) de acuerdo a Pimentel-González et al. (2015). El reactivo ABTS 7 μ M, reaccionó con persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$), 2.45 μ M, en proporción 1:1, la reacción se dejó en agitación durante 16 horas en oscuridad y así generar el radical ABTS +, el radical se estabilizó con etanol al 20 % hasta alcanzar una absorbancia de $.7 \pm .01$ a 734 nm. Una vez estabilizado el reactivo se colocaron 2 mL en un tubo se agregaron 200 μ L del extracto de miel, se agitaron y se dejaron en reposo durante 6 min, posteriormente se leyó la absorbancia a 734 nm utilizando como blanco etanol al 20%. Los resultados se calcularon con la siguiente formula y se expresaron como equivalentes de ácido ascórbico en 100 g de miel (mg AAE / 100 g de miel).

$$\text{mg AAE/g} = \frac{(\text{intercepto} * \text{Vol alicuota} * \text{Vol dilución} * 100)}{\text{peso muestra}}$$

9.7 Actividad de eliminación de radicales libres DPPH

Para la actividad antioxidante de DPPH (radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) se realizó de acuerdo a Turkmen et al. (2006). Para la preparación del reactivo DPPH 0.2 Mm se pesaron 7.9 mg y se disolvieron en 100 mL de metanol al 80%, se colocaron en agitación durante 2 horas en oscuridad total para su disolución total, se estabilizó con metanol al 80% hasta alcanzar una absorbancia de $.7 \pm .01$ a 515 nm, se agregaron 2.5 mL y 500 μ L del extracto de miel, posteriormente se incubaron durante 1 hora en oscuridad total, se midió la absorbancia a 515 nm, en un espectrofotómetro, utilizando metanol al 80% como blanco. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido ascórbico en 100 g de miel (mg AAE / 100 g de miel).

9.8 Azúcares reductores

Los azúcares reductores se determinaron de acuerdo a Ricardo-Sposina et al. (2012) con algunas modificaciones. Para preparar el reactivo 3,5 diantrosalicílico (DNS) se pesó .1 g del reactivo DNS y 30 g de tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) estos se disolvieron en 20 mL de hidróxido de sodio (NaOH) y posteriormente se aforaron a 100 mL con agua destilada y se colocó en agitación durante 24 horas en oscuridad para disolver todos los compuestos, se agregaron 3 mL del reactivo y 2 mL de la dilución del extracto de miel en un tubo de ensayo, se agitaron y se colocó en ebullición durante 5 min, se colocó en un baño de hielo para enfriar y se midió la absorbancia a 575 nm en un espectrómetro. Se utilizó dextrosa para la elaboración de la curva patrón (0-2 mg/L. y los resultados se expresaron como mg / L de azúcares.

9.9 Azúcares totales

Los azúcares totales se determinaron de acuerdo a Odalys Rodríguez-Gómez et al. (2013), con algunas modificaciones. Se preparó una solución de antrona ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}$) pesando 200 mg del reactivo en 100 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 98% en frío, se colocaron 5 mL del reactivo y 2.5 mL de la dilución del extracto (1:10000), se agitaron y colocaron en un baño maría en ebullición durante 10 min, posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 625 nm, utilizando una curva estándar de solución de glucosa a 50 mg / L. Los resultados fueron expresados como mg / L de azúcares.

9.10 Actividad antidiabética in vitro

9.10.1 Inhibición de α -glucosidasa

La inhibición de α -glucosidasa se determinó de acuerdo a (Gondi Roa et al 2015) con algunas modificaciones, los extractos de miel (200 μ L) se mezclaron con 100 μ L de solución de stock (10 mg de 4- nitrofenil 2 mL de solución buffer pH 6.9) y

5.600 ml de buffer de fosfato 0,1 mol / μ L (pH 6,9), posteriormente se preincubaron a 37° C durante 10min, después se agregaron 40 μ L de solución α - glucosidasa y se incubaron durante 20 min a 37 ° C posteriormente se le agregaron 4mL de NaCO₃ 1 M (10.6 g en 100ml de H₂O destilada) y 5 ml de agua destilada, posterior a esto se leyó la absorbancia a 405 nm en un espectrómetro (6715 UV/Vis Spectronic Genesys) y se calculó la inhibición de la α -glucosidasa (%).

9.10.2 Inhibición de α -amilasa

La inhibición de la α -amilasa se determinó de acuerdo a Rabia et al. 2020 con algunas modificaciones donde la solución buffer de fosfato de sodio 0.02 mol / μ L (pH 6.9) se mezclaron con 300 μ L de almidón al 2% y se encubaron a 37° C durante 10 min posteriormente se agregaron 50 μ L de la enzima α -amilasa (.02 unidades/mL) y 50 μ L del extracto de miel y se incubaron nuevamente a 37° C durante 20 min , después se agregaron 300 μ L de DNS (1g de DNS disuelto en 20 ml de NaOH al 10% y aforado a 100 ml). Posteriormente, los tubos de ensayo se incubaron en un baño de agua caliente durante 5 min y luego se enfriaron a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 540 nm. Los resultados se compararon con el control (la muestra se reemplazó por tampón) y se calculó la actividad de inhibición de la α -amilasa (%) con la siguiente formula.

$$\% \text{ inhibicion de } \alpha - \text{amilasa} = \left(= \frac{Abs_{control} - Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \right) \times 100$$

10 Analisis estadístico

Se realizó la comparación múltiple por ANOVA. Cuando existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos se realizó la comparación de medias por el método de Tukey utilizando el software NCSS 2007 (EE.UU.).

11 Resultados y Discusiones

11.1 Azúcares reductores

De acuerdo a la metodología antes mencionada se obtuvieron los siguientes resultados del contenido de azúcares reductores con diferentes tiempos de tratamiento ultrasónico (tabla 1), se observó que tenían un contenido de 21.776 ± 6.25 mg/g con diferencias significativas de ($p < 0.05$) en los distintos tratamientos que se les dio a cada una, obteniendo que las mieles P-B,18, P-A1 y A-B son las que contiene una menor cantidad de azúcares reductores.

La disminución del contenido de azúcares se puede observar en la Fig.1 donde el tiempo de tratamiento con mejores resultados fue el de 20 min siendo diferente a todos los demás, de acuerdo a la literatura (Rohling et al., 2018) la disminución del contenido de azúcares con ultrasonido se debe al proceso de cavitación que genera el ultrasonido, ya que esta rompe la pared celular desde adentro y así las cadenas de azúcares son liberadas y separadas.

Tabla 3. Contenido de azúcares reductores de los extractos de miel

Azúcares reductores mg Eq G/ 100 g				
Miel	0 min	10 min	20 min	30 min
J-A	$21.157 \pm 0.05eBC$	$21.157 \pm 0.0eC$	$16.339 \pm 0.23eA$	$20.180 \pm 0.14eB$
J-A1	$20.018 \pm 0.09dBC$	$19.562 \pm 0.18dC$	$17.966 \pm 0.23dA$	$19.822 \pm 0.18dB$
P-A	$18.422 \pm 0.05acBC$	$18.976 \pm 0.18acC$	$18.748 \pm 0.23acA$	$18.162 \pm 0.23acB$
P-B	$18.780 \pm 0.18cBC$	$19.920 \pm 0.05cC$	$17.283 \pm 0.0cA$	$18.618 \pm 0.05cB$
P-A1	$19.106 \pm 0.09aBC$	$15.655 \pm 0.18aC$	$19.529 \pm 0.05aA$	$19.139 \pm 0.05aB$
A-B	$18.487 \pm 0.05bBC$	$20.799 \pm 0.09bC$	$17.706 \pm 0.14bA$	$19.334 \pm 0.23bB$

Nota: diferentes letras representan diferencias significativas, letras mayúsculas representan columnas, letras minúsculas representan filas.

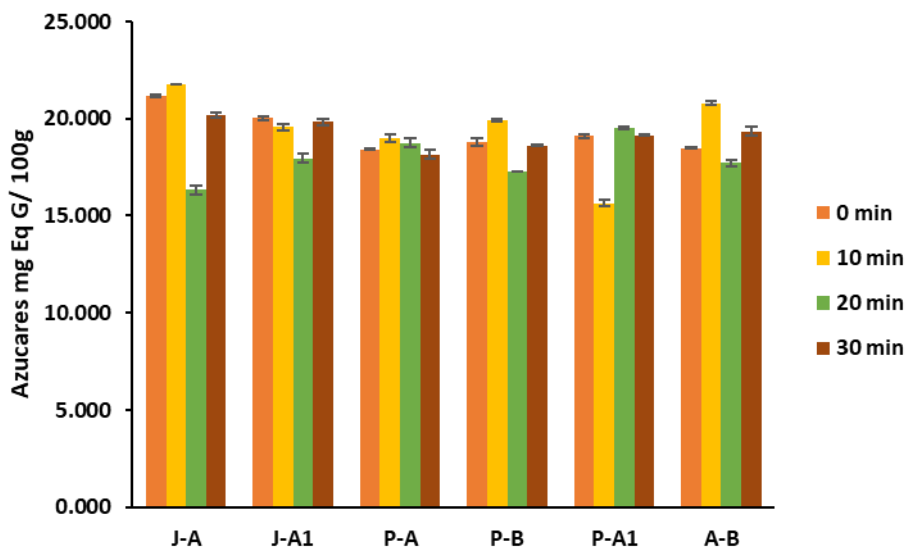


Figura 3. Contenido de azúcares en las distintas mieles y tiempos de ultrasonido

Representan una diferencia significativa ($P < 0.05$) dentro de las columnas (entre los tiempos) según lo determinado por la comparación de promedios de Tukey. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. El código se expresa con las primeras letras el municipio de donde fue obtenida la miel J: San Jerónimo. P: San Pablo Ocopetatillo, A: San Antonio y las letras A, B son el color de la miel A: ámbar y B: blanca.

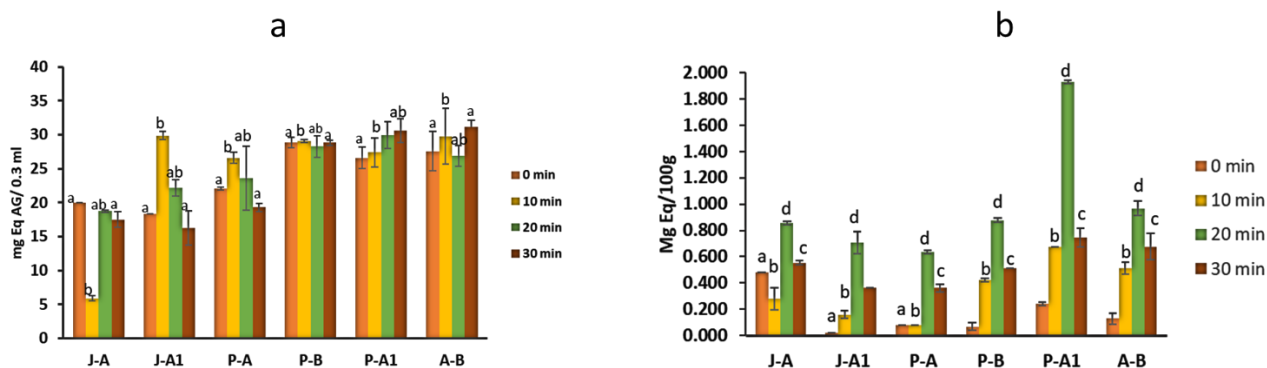


Figura 4: Efecto del ultrasonido a diferente tiempo (0, 10, 20, 30 min) en diferentes mieles en sus compuestos bioactivos

Nota: a) fenoles totales, b) flavonoides totales representan una diferencia significativa ($P < 0.05$) dentro de las columnas (entre los tiempos) según lo determinado por la comparación de promedios de Tukey. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. El código se expresa con las primeras letras el municipio de donde fue obtenida la miel J: San Jerónimo. P: San Pablo Ocopetatillo, A: San Antonio y las letras A, B son el color de la miel A: ámbar y B: blanca.

11.2 Fenoles

El contenido total de fenoles para los extractos analizados se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la mayoría de las muestras, siendo las mieles P-B (29.917 ± 1.56 mg Eq AG/100 g), P-A1 (28.260 ± 1.95 mg Eq AG/100 g) y A-B (26.878 ± 1.56 mg Eq AG/100 g) las de mayor contenido de fenoles y el tiempo de 20 min el mejor para poder aumentar estos compuestos fig. (2a) el mejor para la incrementación de estos compuestos.

Maja et al., 2020 observaron que los pre tratamientos con ultrasonido en el contenido fenólico aumentaron ligeramente en la mayoría de las muestras. El valor más alto se registró en la muestra 3 (1.570 mg GAE/g), y el más bajo en la muestra 4 (1.453 mg GAE/g). A diferencia de los pretratamientos con ultrasonido, el pretratamiento con calor provocó una reducción significativa del contenido fenólico.

11.3 Flavonoides

El contenido de flavonoides mostraba diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cada una de las mieles donde la miel P-A1 (1.929 ± 0.01 mg Eq Q/100 g) tiene un incremento de estos compuestos desde los 10 min Fig. (2b) de tratamiento ultrasónico. Así mismo siendo el tiempo de 20 min donde se presentó el mayor incremento de estos compuestos con diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tiempos de tratamiento.

De acuerdo a Pittaya Chaikham et al., 2015 el aumento en estos compuestos bioactivos se debe principalmente a la degradación de las células vegetales ya que las membranas celulares y organelos se rompen y las enzimas se liberan a través de las vacuolas que afectan los fenoles y flavonoides, en el caso de la miel se debe a la desintegración del grano del polen.

11.4 Eliminación de los radicales libres ABTS Y DPPH

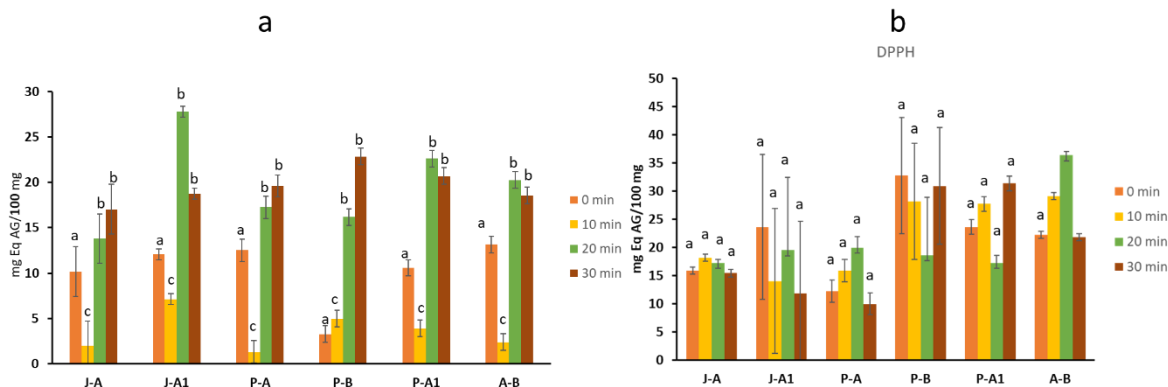


Figura 5. Efecto del ultrasonido a diferente tiempo (0, 10,20,30 min) en diferentes mieles en su capacidad antioxidante

Nota: a) ABTS, b) DPPH, representan una diferencia significativa ($p < 0.05$) dentro de las columnas (entre los tiempos) según lo determinado por la comparación de promedios de Tukey. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. El código se expresa con las primeras letras el municipio de donde fue obtenida la miel J: San Jerónimo. P: San Pablo Ocopetatlillo, A: San Antonio y las letras A, B son el color de la miel A: ámbar y B: blanca.

En la actividad antioxidante se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las mieles analizadas y los tiempos de extracción. En la prueba de inhibición del radical ABTS, los mayores contenidos se encontraron en los tiempos de 20 y 30 min y en los siguientes extractos J-A1 (22.623 ± 0.3 mg Eq AG/100 mg), P-B (22.838 ± 1.2 mg Eq AG/100 mg) y P-A (27.784 ± 0.3 mg Eq AG/100 mg).

En la prueba DPPH no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos, pero si entre las mieles, la miel A-B obtuvo (36.379 ± 3.868 mg Eq AG/100 mg), mostrando diferencias significativas con respecto al resto de muestras de miel. Maja et al 2020 obtuvo resultados similares, en donde mieles tratadas con ultrasonido tuvieron un aumento en los valores del DPPH de 0,346 GA/mg a 0,406346 GA/mg.

Quintero-Lira et al. (2017) demostraron que todos los tipos de miel sometidos a ultrasonido durante cinco minutos mostraron cambios insignificantes en los ácidos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante, pero después de 15 min de pretratamiento, estos parámetros aumentaron en algunos tipos de miel.

11.5 Inhibición de enzimas α -amilasa y α -glucosidasa

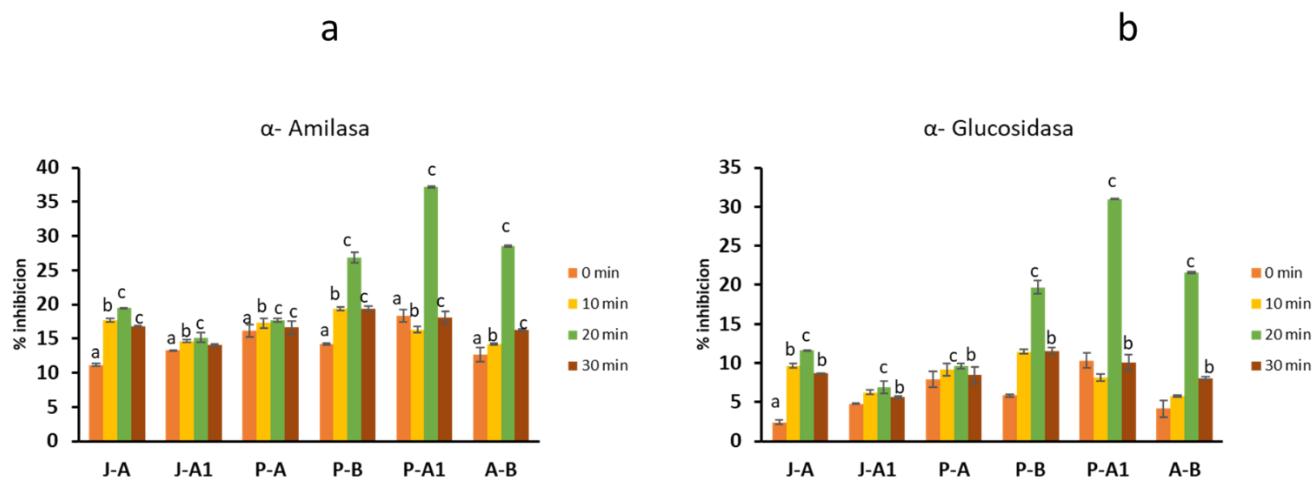


Figura 6. Efecto del ultrasonido a diferente tiempo (0, 10,20,30 min) en diferentes mieles en su capacidad de inhibición

Nota: a) α -amilasa, b) α -glucosidasa, representan una diferencia significativa ($p < 0.05$) dentro de las columnas (entre los tiempos) según lo determinado por la comparación de promedios de Tukey. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. El código se expresa con las primeras letras el municipio de donde fue obtenida la miel J: San Jerónimo. P: San Pablo Ocopetatillo, A: San Antonio y las letras A, B son el color de la miel A: ámbar y B: blanca.

En la inhibición de las enzimas se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de extracción. En la prueba de inhibición de α -amilasa la mayor inhibición se encontró en el tiempo de 20 min (Fig. 3a) teniendo un 53 % comparado con el control. Los extractos con índice mayor de inhibición fueron, J-A (19.487%), P-B (26.867 %), P-A (37.146 %), SA-B (28.540%).

En la inhibición de α -glucosidasa el mejor tiempo de inhibición fue el de 20 minutos teniendo un 42% comparado con el control (fig. 3 b), las mieles con mayor poder inhibitorio fueron SP-B (19.706%), P-A (30.991%), A-B (21.542%). Meza et al 2015 obtuvo resultados parecidos en extractos de hojas de yacón en donde el porcentaje de inhibición de amilasa fue del 50%.

Los resultados obtenidos para glucosidasa son cercanos a los obtenidos por, Céspedes et al., 2019 los cuales indicaban que en extractos de hojas de guayaba se encontraron valores entre el 90 y 45% de inhibición sobre la enzima α -glucosidasa.

Gondi et al., 2015 observaron que el potencial inhibitorio varía según los aspectos estructurales de los ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas, y el potencial de inhibición de los compuestos también varía según la fuente de la enzima.

12 Conclusiones

La miel con mejores resultados con la extracción con ultrasonido fue la del municipio San Pablo Ocopetatillo con un contenido de, fenoles de $(29.917 \pm 1.56 \text{ mg Eq AG/100 g})$, flavonoides $(1.929 \pm 0.01 \text{ mg Eq Q/100 g})$, capacidad antioxidante ABTS $(27.784 \pm 0.3 \text{ mg Eq AG/100 mg})$.

La mayor inhibición fue con el extracto obtenido por ultrasonido en 20 min con una inhibición de α -amilasa con $37.146 \pm 0.09 \%$ y de α -glucosidasa con 30.991 ± 0.104 . Las mieles cuentan con compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y antidiabéticas que dan una alternativa natural y saludable para tratar a las personas con diabetes mellitus.

13 Referencias

1. Ahmed S, Sulaiman S, Baig A. (2018). Review Article Honey as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Its Molecular Mechanisms of Action. Hindawi. 1-20. <https://doi.org/10.1155/2018/8367846>
2. Aldona Dembinska K, Otto M, Beata Kiec-W, Hannu M. 2008 Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. British Journal of Nutrition 99 a,(pp.109–117)
3. Ayelen Z, Zampedri, P.(2018). Evaluación de la digestión in vitro de compuestos bioactivos de arándanos, ciencia , docencia y tecnología. (29)57.
4. Ball David W.(2007). The Chemical Composition of Honey. Department of Chemistry, Cleveland State University, Cleveland. 84
5. Brutsaert Erika. (2020). Estado hiperglucémico hiperosmolar.. <https://www.msmanuals.com/es-mx/professional/trastornos-endocrinol%C3%B3gicos-y-metab%C3%B3licos/diabetes-mellitus-y-trastornos-del-metabolismo-de-los-hidratos-de-carbono/estado-hiper gluc%C3%A9mico-hiperosmolar-ehho>
6. Canalejo, B. (2017). Diabetes tipo 2 y enfermedades neurodegenerativas. Facultad de farmacia. (pp.1-20)
7. Céspedes M, Estrada J.(2019). Evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima alfa glucosidasa con extractos de hojas de guayaba (psidium guajava l.).
8. Chemat F, Huma Z, Muhammed K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. Ultrasonics Sonochemistry (18), (pp.813–835).
9. Córdova C, Ramírez E, Martínez E, Zaldívar J. (2013). Botanical characterisation of honey (Apis mellifera L.) from four regions of the state of Tabasco, México, by means of melisopalynological techniques. Universidad y ciencia tropico húmedo. (pp. 163-178)

10. De Melo A, Almeida L, Sancho M y Pascual A. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*. Jun 2017. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2017.1338444>
11. Desta Tamene Letik. 2021 Type 2 Diabetes and Aging: Do Dietary Phytochemicals & Antioxidants Matter?. *Academia Letters*, (pp. 2-8)
12. Escriche I, Kadar M, Juan M, Domenech E. (2014). Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication
13. Escrichea I, Kadarb M, Domenecha E. (2014). Of honey. Impact of industrial thermal treatment. *Food Chemistry*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.033>
14. Escuredo O, Miguez M, Fernandez M, Seijo C. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic área. *Food Chemistry*, (pp.851–856)
15. Federación Internacional de Diabetes (2019). *Idf Diabetes atlas- 9 the edition..* <https://diabetesatlas.org/es/>
16. Figuero J. (2020) *Revista de Investigación Científica de Apiterapia Clínica.* <https://apiterapiarevistacom.wordpress.com>
17. Garcia H, Mendiola E, Ayala G. (2011). Revisión actual de los conocimientos sobre la absorción intestinal de carbohidratos y su relación con la prevención del riesgo cardiovascular. *Medicina interna de México*, (270)3, (pp. 270-280).
18. García P, Gallardo G. (2007). Evaluación de la absorción y metabolismo intestinal. *Nutrición hospitalaria*, (pp.1-9).
19. Gondi M, Rao P. (2015). Ethanol extract of mango (*Mangifera indica* L.) peel inhibits α -amylase and α -glucosidase activities, and ameliorates diabetes related biochemical parameters in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *J Food Sci Technol* 52(12), (pp.7883–7893), DOI 10.1007/s13197-015-1963-4.
20. Hasan T, Sultana M. (2018). Antidiabetic Potency of Bangladeshi Medicinal Plants. *Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*, 4(1), (pp.35-42)

21. Hernandez A, Chavez D, Cenobio A. (2021). Characterization of Total Phenol and Flavonoid Contents, Colour, Functional Properties from Honey Samples with Different Floral Origins. *International Journal of Food Studies*, 10 (pp.346-358)
22. Hernandez A, Chavez D, Cenobio A. (2021). Characterization of Total Phenol and Flavonoid Contents, Colour, Functional Properties from Honey Samples with Different Floral Origins," *International Journal of Food Studies* (10).
23. Kazeem M, Ogunwande I. (2013). Modes of inhibition of α -amylase and α -glucosidase by aqueous extract of morinda lucida benth leaf. Hindawi Publishing Corporation, Article ID 527570. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/527570>
24. Khan S, Anjum S. (2017). Honey: Single food stuff comprises many drugs. *Saudi journal of biological Sciences*, 25, 320-325. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.08.004>
25. Kumar M, Tripathi J. (2015). Ethno medicinal plants with antidiabetic activity: a review. *Yadav & Tripathi, IJPSR*, 6(11), (pp.4570-4578).
26. Links M, Taylor J, Kruger M, Taylor J.(2015). Sorghum condensed tannins encapsulated in kafirin microparticles as a nutraceutical for inhibition of amylases during digestion to attenuate hyperglycaemia. *journal of functional foods* (12), (pp.55–63)
27. Lobos I, Currián M.(2020). Composición nutricional y calidad de la miel producida en el territorio patagonia verde. *Apicultura en el Territorio Patagonia Verde, Región de Los Lagos*.
28. López L. (2013). Elaboración, control de calidad y evaluación de la actividad antidiabética de la miel de agave (*Agave americana* L).
29. Maja S, Dragoljub C.(2020) Changes in the physicochemical, antioxidant and antibacterial properties of honeydew honey subjected to heat and ultrasound pretreatments. *Association of Food Scientists & Technologists*.
30. Mamun-or-R Md, Shamim H, Naim H, Biplab, Kumar D.(2014). Ashrafuzzaman S, Monokesh Kumer S. A review on medicinal plants with

- antidiabetic activity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 3(4) (pp.149-159)
31. Manita D, Mritunjoy K, Ananta S, Sanjib B , Sanswring B. (2019). An ethnobotanical survey of antidiabetic medicinal plants used by the Bodo tribe of Kokrajhar district, Assam. *Indian Journal of Traditional Knowledge* 18(3) (pp.421-429)
32. Martínez S, González J, Culebras J. (2002) Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, (pp. 271-278).
33. Medina G, Estefes J, Afanador L. (2020). Encapsulation Preserves Antioxidant and Antidiabetic Activities of Cactus Acid Fruit Bioactive Compounds Under Simulated Digestion Conditions. *25*,(pp. 57-36).
34. Medina G., Zaldívar A, Cenobio A, Afanador L, Vieyra R, Estefes J y Campos R. (2019). Antidiabetic Activity of Cactus Acid Fruit Extracts: Simulated Intestinal Conditions of the Inhibitory Effects on α -amylase and α -glucosidase. *Applied Sciences*, 9(19).
35. Meo S, Al-Asiri S, Mahesar A, Ansari A. (2017). Review Role of honey in modern medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*. (pp. 975-978). <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.010>
36. Meza D, Medina R. (2015) Inhibición in vitro de las enzimas alfa-amilasa y lipasa pancreática por fracciones fenólicas de extractos etanólicos de hojas de Yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl). *Avances en Química*, 10(1), (pp. 33-40)
37. Minekus M, Alvinger M, Alvito P. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*.
38. Moniruzzaman M, Khalil M, Sulaiman S, Gan S. (2012). Advances in the analytical methods for determining the antioxidant properties of honey: a review. <http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v9i1.5>.
39. NOM-004-SAG/GAN-2018. (2018). NORMA Oficial Mexicana NOM-004-SAG/GAN-2018, Producción de miel y especificaciones.

40. Peiró, P. (2019). Miel como medicina. *Medicina naturista*, (13), (pp.34-37).
41. Pelaez A., Gonzalez A.C., Figueira J.E., Cobos V. (2021). Bioactive compounds and antibacterial activities in crystallized honey liquefied with ultrasound, journal homepage.
42. Peng S, Ling Chin N, Yus A, Wei S, Suan L.(2017). Classification of entomological origin of honey based on its physicochemical and antioxidant properties. ISSN: (pp.1094-2912,1532-2386)Journal homepage.
43. Pimentel D.(2015). Effect of thermal processing on antibacterial activity of multifloral honeys. doi:10.1111/jfpe.12279
44. Pittaya chaikhamun, Pattaneeya Prangthipb. (2015). Alteration of antioxidative properties of longan lower-honey after high pressure, ultra-sonic and thermal processing” *Food Bioscience* (10).
45. Quintero A. Ángeles Santos. (2017). Efectos de la licuefacción de la miel cristalizada por ultrasonidos sobre el tamaño de los cristales, 5-hidroximetilfurfural, color, compuestos fenólicos y actividad antioxidante *Tecnología Eur Food Res*.
46. Rababah, Muhammad al-u'datt. (2013). Chemical, functional and sensory properties of carob juice. *Journal of Food Quality* ISSN 1745-4557.
47. Rabia El Adaouia T, Noureddine D. (2020). In vivo and in vitro anti-diabetic activity of ethanolic propolis extract”. *Food Biochem*.
48. Rajan Murugan, Rahul Chandran, Thangaraj Parimelazhagan. (2016). Effect of in vitro simulated gastrointestinal digestion of Phoenix loureirii on polyphenolics, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Food Science and Technology*, 74, 363e370.
49. Reyes F, Pérez M, Figueredo E, Ramírez M, Jiménez Y. (2016). Type 2 Diabetes Mellitus Current Treatment.
50. Reyes M, Morales J, Osiris E.(2009) Diabetes. Tratamiento nutricional. *Med Int Mex*. (pp.454-460).
51. Rodríguez Q, Lage-Yusty, y López J.(2010). Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption. *Food Chem*. (121) (pp.634-638).

52. Rodriguez R, Rojas M.(2013). Cambios en los perfiles de vitamina C, fenoles y carotenoides a lo largo de la digestión gastrointestinal in vitro de un jugo de frutas mezclado. *J. Agric. Química alimentaria*,(pp. 61, 1859-1867). [dx.doi.org/10.1021/jf3044204](https://doi.org/10.1021/jf3044204)
53. Rybak-Chmielewska H ,Szczęsna T. (2013). Characteristics of polish unifloral honeys iv. Honeydew honey, mainly *abies alba* L. *Journal of Apicultural Science* (57) 1.
54. Samira N, Boumedienne M y Abdelkader A. (2013). Melissopalynological Characterization of North Algerian Honeys, (pp.83-89), [doi:10.3390/foods2010083](https://doi.org/10.3390/foods2010083)
55. Santos S, González A. (2017). Chemical Composition of Honey (3).
56. SEDER. 2019. <http://www.agricultura.gob.mx/sader-2019>
57. Silva P, Gauche C, Gonzaga L. (2015). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, (pp.1-61). <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>
58. Silva P, Gauche C, Valdemiro L, Oliveira A, Fett R.(2015). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry* <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>
59. Solayman, Md., Islam, A., Paul, S (2016). Physicochemical properties, minerals, trace elements, and heavy metals in honey of different origins: a comprehensive review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, (15), (pp. 219-233). doi: 10.1111/1541-4337.12182
60. Stephen A, Ganiyu O. (2013). Phytochemistry and mode of action of some tropical spices in the management of type-2 diabetes and hypertension. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(7), (pp.332-346)
61. Switi B, Gaikwad G, Krishna M, Sandhya R. (2014). Phytochemicals for Diabetes Management. *Pharmaceutical Crops*, (pp.11-28)
62. Tagliazucchi D, Verzelloni E, Bertolini D. (2010) In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry* (120), (599–606).

63. Talebia M, Talebib M, Farkhondehd T, Samarghandian S. (2020). Molecular mechanism-based therapeutic properties of honey. *Biomedicine & Pharmacotherapy* (130)10590.
64. Tornuka F, Karamanb S, Ozturkb I, Toker O.(2013). Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.042>
65. Tovar C, Gonzales O, Gómez, L. (2013). La a-amilasa salival: relación con la caries dental y la salud en general: Salivary a-Amylase: Relation with Dental Caries and Health in General. *Univ Odontol.* (pp.93-103).
66. Turkmen N, Sari F, Ender S.(2005). Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry* (95), (pp.653–657)..
67. Ulloa J. (2010). La miel de abeja y su importancia.(pp.11-18).
68. Vandamme L, Heyneman A. (2013). Honey in modern wound care: A systematic review. *Sciverse.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2013.06.014>
69. Villalobos J, Barriguete A. (2008). Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Secretaria de salud México*, 50,(pp. 419- 427).
70. Wen Qi L, Peng Y, E-Hu Liu, Ping Li. (2010). Anti-Diabetic Agents from Natural Products-An Update from. *Current Topics in Medicinal Chemistry* (10), (pp. 434-457)