



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

---

---

**“Caracterización y evaluación *in vivo* del efecto antilitiásico de un alimento de diseño a partir de productos apiaros”.**

Tesis que para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y  
SALUD HUMANA**

Presenta:

**M. en C. GLORIA ISABEL CAMACHO BERNAL**

Director(a) de Tesis

**DRA. NELLY DEL SOCORRO CRUZ CANSINO**

Co-Director(a) de Tesis

**DRA. ESTHER RAMÍREZ MORENO**

San Agustín Tlaxiaca, Hgo., noviembre 2023



San Agustín, Tlaxiaca, Hgo., octubre 2023  
 ICSa-DCASH-Octubre 2023  
 Asunto: Autorización de impresión

**Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado**  
**Directora de Administración Escolar**

Por este medio se informa que el comité tutorial asignado al M. en C. Gloria Isabel Camacho Bernal con número de cuenta 164046, estudiante del Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana ha terminado el trabajo de tesis titulado “Caracterización y evaluación *in vivo* del efecto antilitiásico de un alimento de diseño a partir de productos apiaríos” y por lo tanto se autoriza la impresión del documento en extenso propuesto por el/la estudiante después de haber sido revisado, analizado y evaluado de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 73, VI del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Lo anterior, en función de que, el/la estudiante realizó todas las correcciones, adiciones y/o modificaciones sugeridas por el comité en la revisión previa con fecha 16 de octubre 2023.

Por tal motivo, solicitamos a usted tenga a bien permitir al doctorando dar continuidad al proceso necesario que conlleve a la obtención del grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana.

DRA. NELLY DEL SOCORRO CRUZ CANSINO  
 Directora de tesis

DRA. ESTHER RAMÍREZ MORENO  
 Codirectora

DRA. ARACELI CASTAÑEDA OVANDO

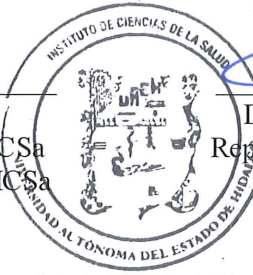
DR. LUIS DELGADO OLIVARES

A T E N T A M E N T E  
 Pachuca, Hidalgo, 16 de octubre del 2023  
 “Amor, Orden y Progreso”

M. C. Esp. Enrique Espinosa Aquino  
 Director del Instituto de Ciencias de la Salud  
 Dean

Dra. Guadalupe López Rodríguez  
 Jefa del Área Académica de Nutrición  
 Chair of Academic Area of Nutrition

Dra. Lydia López Pontigo  
 Coordinadora de Posgrado del ICSa  
 Director of Graduate Studies of ICSa



Dra. Teresita de Jesús Saucedo Molina  
 Representante del Programa Educativo ICSa  
 Director of Graduate Studies





ICSa-DCASH/2023

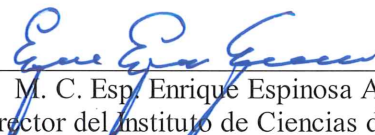
Asunto: Constancia de cumplimiento de requisitos académicos

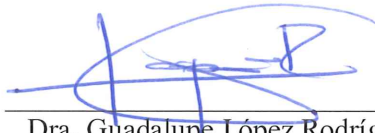
**MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO**  
**DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR**  
**P R E S E N T E**

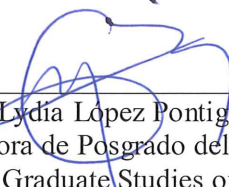
Por este medio se informa que **GLORIA ISABEL CAMACHO BERNAL**, estudiante del **DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y SALUD HUMANA**, ha concluido publicando el artículo indizado “Addition of Bee Products in Diverse Food Sources: Functional and Physicochemical Properties” y con los requisito (s) académicos (s).

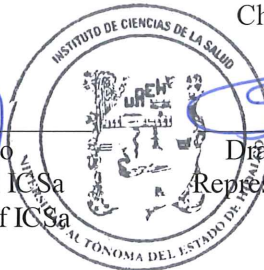
Debido a lo anterior, la/el estudiante cumple con los requerimientos de egreso establecidos por el programa educativo de posgrado. Por lo que solicitamos a usted tenga a bien permitir a esta coordinación dar continuidad al proceso de obtención de grado.

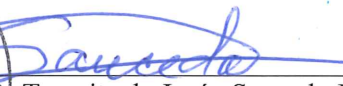
**A T E N T A M E N T E**  
 Pachuca, Hidalgo a 16 de octubre de 2023  
 “Amor, Orden y Progreso”

  
 M. C. Esp/ Enrique Espinosa Aquino  
 Director del Instituto de Ciencias de la Salud  
 Dean

  
 Dra. Guadalupe López Rodríguez  
 Jefa del Área Académica de Nutrición  
 Chair of Academic Area of Nutrition

  
 Dra. Lydía López Pontigo  
 Coordinadora de Posgrado del IC Sa  
 Director of Graduate Studies of IC Sa



  
 Dra. Teresita de Jesús Saucedo Molina  
 Representante del Programa Educativo IC Sa  
 Director of Graduate Studies

ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN



Algunos de los resultados obtenidos de este proyecto fueron presentados en los siguientes foros científicos y de investigación:

-11er Congreso Internacional “La investigación en el posgrado”. Cuantificación de flavonoides y ácidos fenólicos de productos apíarios (miel, polen, jalea real y propóleo) mediante HPLC. Celebrado del 13 al 15 de octubre del 2021, obteniendo reconocimiento a mejor ponencia.

-12º Congreso Internacional “La investigación en el posgrado”. Análisis multielemental de minerales en miel, polen, jalea real y propóleo mediante espectrometría de emisión óptica de acoplamiento inductivo (ICP-OES) y su relación con la salud humana. Celebrado del 12 al 14 de octubre del 2022, obteniendo reconocimiento a mejor ponencia.

-Conferencia en Foro científico de la Universidad Veracruzana. Productos apíarios y su participación en la salud humana. Celebrado el 18 de enero del 2023.

-1er Congreso Internacional multidisciplinario de la divulgación científica. Efecto protector de una formulación a base de productos de la colmena, sobre los cambios histológicos en la litiasis, nefrotoxicidad y hepatotoxicidad inducida por etilenglicol, en ratas Wistar. 13 de octubre del 2023.

### **Publicaciones:**

Camacho-Bernal, G.I.; Cruz-Cansino, N., Ramírez-Moreno, E., Delgado-Olivares, L., Zafra-Rojas, Q.Y., Castañeda-Ovando, A., Suárez-Jacobo, Á. (2021). Addition of bee products in diverse food sources: functional and physicochemical properties. *Appl. Sci.*, 11, 8156. <https://doi.org/10.3390/app11178156>

### *Agradecimientos institucionales*

Durante el desarrollo de este trabajo, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCyT), No. CVU: 855415.

Se extiende el agradecimiento a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por permitir la realización de este proyecto, en los laboratorios pertenecientes a esta casa de estudios.

Un profundo y grato agradecimiento a los investigadores externos que contribuyeron al fortalecimiento de este proyecto:

-A la M. en A. Patricia Velásquez González, gerente de experimentación del Centro Experimental Oaxaca, del Servicio Geológico Mexicano (SGM), por las facilidades para la colaboración.

-Al Biol. Álvaro Rubén Hernández Cruz, adscrito al Laboratorio de Anatomía Patológica, en el Hospital del Niño DIF, Hidalgo.

-Al Dr. Francisco Martín Barajas Olmos, investigador en Ciencias Médicas, del Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades metabólicas, a la Dra. Esp. en Patología Clínica Xchelha Martínez Montiel, del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

-A la Dra. Carolina Barrientos Salcedo, del Laboratorio de Química Médica, perteneciente a la Facultad de Bioanálisis de la Universidad Veracruzana (UV).

### ***Agradecimientos y dedicatorias***

A mi directora la Dra. Nelly y codirectora de tesis Dra. Esther, sin ustedes y sus virtudes, paciencia, constancia y calidez, sin duda este proyecto no hubiese sido lo mismo sin ustedes, muchas gracias por sus palabras de aliento cuando más las necesité y también por estar de pie junto conmigo cuando mi arduo trabajo en el laboratorio parecía interminable, pero sobre todo por ser un ejemplo para mí. A la Dra. Araceli Castañeda por sus enseñanzas, paciencia, dedicación y por hacerme una mejor estudiante de doctorado. Al Dr. Luis, Delgado por acompañarme en el proceso con sus consejos, guía y experiencia. Agradecida estoy enormemente con todos ustedes, los admiro y sin duda marcaron mi camino de buena forma. A mi mamá y papá, por su amor, educación y fortaleza, que me dieron cuando este proceso se tornaba aún más difícil y por sus palabras de aliento y profundo amor, deseo tenerlos mucho tiempo más conmigo para cosechar los frutos de este proyecto y los que se aproximen. A mi esposo Jorge, mi compañero de vida que me ha acompañado, gracias por tu paciencia, comprensión, por felicitar me y festejar mis logros, por muy pequeños que parecieran, sabes que logro también es tuyo, te agradezco infinitamente.

A mis amigas y compañeras de laboratorio, Mary, Ara, Lili, Lis, Mine, Caro, Wendy, Eli, Zac, Van Bautista, Van González, por hacer más amenas esas tardes de experimentación, cuando apenas era inicio de semana y sentíamos que ya habíamos dado todo, gracias enormemente por cruzarse en mi camino, siempre las llevo en el corazón, son y serán parte de mi motivación por ser cada vez mejor. Sin duda, también agradezco su tiempo fuera de lo académico, las risas, la diversión, el cariño que me dieron y sobretodo, por ser parte de mis alegrías y momentos importantes, deseo de corazón que lo sigamos haciendo posible.

Por último, a mis amigas Ena, Aby y Yaz, por haber construido tantos y tantos recuerdos, por convertirse en uno de los pilares que me mantuvieron fortalecida para culminar este proceso y a su vez, por convertirse en el refugio emocional más cálido que tengo. Espero tener la fortuna de que continúen a mi lado, durante mucho más tiempo.

*“Cualquier cosa que la mente del hombre puede concebir y creer, puede ser conseguido”*

Napoleon Hill

## ÍNDICE GENERAL

Resumen .....	11
Abstract.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. MARCO TEÓRICO .....	16
2.1. Apicultura y obtención de los productos apiaros .....	16
2.2. Miel .....	16
2.3. Polen.....	17
2.4. Jalea real.....	18
2.5. Propóleo .....	18
2.6. Producción de miel.....	18
2.7. Caracterización de los productos apiaros.....	21
2.8. Nefrolitiasis o litiasis renal.....	22
2.9. Evaluación de las propiedades funcionales y del efecto antilitiásico de alimentos funcionales y productos de la colmena en modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . .....	26
2.10. Alimento de diseño y ejemplos .....	31
3. JUSTIFICACIÓN.....	33
4. HIPÓTESIS .....	33
5. OBJETIVOS.....	34
5.1. Objetivo general .....	34
5.2. Objetivos específicos.....	34
6. DISEÑO METODOLÓGICO .....	35
6.1. Diagrama del diseño experimental.....	35
6.2. Obtención de las muestras y preparación del producto.....	36
7. METODOLOGÍAS .....	36
7.1. Flavonoides y ácidos fenólicos por HPLC.....	36
7.2. Contenido de ácido L-ascórbico y L-dehidroascórbico .....	39
7.3. Ácidos grasos .....	39
7.4. Composición mineral .....	40
7.5. Propiedades fisicoquímicas .....	41
7.5.1. Actividad de agua ( $a_w$ ).....	41
7.5.2. pH .....	41
7.5.3. Acidez.....	41

7.5.4.	Hidroximetilfurfural (HMF).....	42
7.5.5.	Determinación de color .....	42
7.6.	Parámetros cinéticos.....	42
7.6.1.	Orden de reacción y constante de velocidad de deterioro .....	42
7.6.2.	Tiempo de vida media .....	43
7.6.3.	Determinación de la energía de activación.....	43
7.7.	Evaluación sensorial.....	44
7.8.	Contenido de antioxidantes .....	45
7.8.1.	Compuestos fenólicos totales .....	45
7.8.2.	Ácido L-ascórbico .....	45
7.9.	Capacidad antioxidante .....	46
7.9.1.	DPPH <sup>•+</sup> .....	46
7.9.2.	ABTS <sup>•+</sup> .....	46
7.9.3.	FRAP .....	46
7.10.	Actividad quelante.....	47
7.11.	Bioaccesibilidad intestinal <i>in vitro</i> .....	47
7.12.	Dosis letal 50 (DL <sub>50</sub> ) .....	48
7.13.	Evaluación del efecto antilitiásico.....	49
7.13.1.	Diseño experimental .....	49
7.13.2.	Examen químico de la orina .....	50
7.13.3.	Análisis del sedimento urinario .....	50
7.13.4.	Ensayos bioquímicos plasmáticos .....	50
7.13.5.	Recolección de orina de 24 horas .....	52
7.13.6.	Ensayos bioquímicos en orina .....	52
7.13.7.	Método de analgesia y eutanasia .....	52
7.13.8.	Análisis histológico.....	52
7.14.	Análisis estadístico .....	53
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
8.1.	Caracterización del alimento de diseño.....	53
8.1.1.	Identificación y cuantificación de flavonoides y ácidos fenólicos .....	53
8.1.2.	Contenido de ácido L-ascórbico y ácido L-dehidroascórbico en miel, polen y jalea real.....	59
8.1.3.	Ácidos grasos.....	60
8.1.4.	Contenido de minerales .....	63
8.2.	Parámetros fisicoquímicos durante el almacenamiento .....	65



8.2.1.	pH, acidez e HMF (hidroximetilfurfural).....	66
8.2.2.	Actividad de agua ( $a_w$ ).....	70
8.2.3.	Evaluación del color .....	71
8.2.4.	Efecto de la temperatura sobre los parámetros de calidad del producto .....	76
8.2.5.	Evaluación sensorial.....	78
8.3.	Contenido, capacidad antioxidante y quelante del alimento de diseño durante el almacenamiento.....	89
8.4.	Bioaccesibilidad <i>in vitro</i> .....	91
8.5.	Toxicidad oral aguda del producto ( $DL_{50}$ ).....	95
8.5.1.	Monitoreo del peso .....	95
8.5.2.	Análisis macroscópico de hígado y riñón.....	97
8.6.	Efecto antilitiásico del producto.....	98
8.6.1.	Análisis de peso, volumen urinario y pH de la orina de los grupos experimentales (pre y post inducción).....	98
8.6.2.	Evaluación clínica urinaria (prueba rápida) de los grupos experimentales durante la administración.....	100
8.6.3.	Examen microscópico del sedimento urinario.....	101
8.6.4.	Evaluación urinaria.....	102
8.6.5.	Análisis bioquímico sérico .....	107
8.6.6.	Análisis histológico .....	109
9.	CONCLUSIONES.....	114
10.	RECOMENDACIONES .....	115
11.	REFERENCIAS .....	116
12.	ANEXOS .....	152

## LISTA DE ABREVIATURAS

4-AF	4 – Aminofenazona
10-HDA	Ácido 10-hidroxi-2-decenoico
10- HDDA	Ácido 10-hidroxi-decenoico
AA	Ácido L-ascórbico
ABTS <sup>+</sup>	(2,2-azino-bis[3-etilbenzotiazolina]-6-ácido sulfónico)
AD	Alimento de diseño
ADA	Asociación Americana de Diabetes
ALA	Ácido $\alpha$ -lipoico
BI	Bioaccesibilidad intestinal
BUN	Balance Urea Nitrógeno
CaOx	Oxalato de calcio
CICUAL	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio
DCPS	Diclorofenol Sulfonato
DHA	Ácido L-dehidroascórbico
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50
DPPH <sup>+</sup>	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
E <sub>a</sub>	Energía de activación
EAA	Equivalentes de ácido ascórbico
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EES	Extracción etanólica y sonicación.
EG	Etilenglicol
ET	Equivalentes de trolox
FAME	Ésteres metílicos de ácidos grasos
FELASA	Federación de Asociaciones Europeas para la Ciencia de los Animales de Laboratorio
FRAP	Poder Antioxidante Reductor Férrico
HAAM	Hidrólisis alcalina y ácida-metanol
HAE	Hidrólisis ácida-etanol
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HMF	Hidroximetilfurfural
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IL6	Interleucina-6
NF- $\kappa$ $\beta$	Factor nuclear kappa $\beta$
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
POD	Peroxidasa
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
SEA	Ácido sebácico
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
TPTZ	2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Producción (ton/año) de principales productores de miel a nivel mundial del 2000 al 2015. ....	19
<b>Tabla 2.</b> Principales estados productores a nivel nacional en 2019.....	20
<b>Tabla 3.</b> Producción de miel en Hidalgo. ....	21
<b>Tabla 4.</b> Características nutricionales y químicas de los productos apíarios.....	23
<b>Tabla 5.</b> Formulación del alimento de diseño.....	36
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de separación de flavonoides por HPLC. ....	38
<b>Tabla 7.</b> Condiciones de separación para ácidos fenólicos por HPLC. ....	38
<b>Tabla 8.</b> Ecuaciones para determinar el orden de reacción .....	43
<b>Tabla 9.</b> Fórmulas para determinar tiempo de vida media .....	43
<b>Tabla 10.</b> Perfil de flavonoides (mg/100 g) de miel, polen, jalea real y propóleo mediante extracción con hidrólisis ácida, éter y etanólica. ....	55
<b>Tabla 11.</b> Perfil de ácidos fenólicos (mg/100 g) de miel, polen, jalea real y propóleo mediante extracción con hidrólisis ácida, éter y etanólica. ....	58
<b>Tabla 12.</b> Contenido de ácido L-ascórbico y ácido L-dehidroascórbico (mg/100 g) de productos apíarios.....	60
<b>Tabla 13.</b> Contenido de ácidos grasos de productos apíarios. ....	61
<b>Tabla 14.</b> Contenido de minerales de los productos apíarios (mg/kg). ....	64
<b>Tabla 15.</b> HMF (mg/kg) del alimento de diseño durante el almacenamiento. ....	69
<b>Tabla 16.</b> Resultados de $a_w$ del alimento de diseño durante el almacenamiento. ....	70
<b>Tabla 17.</b> Coeficientes de regresión lineal a diferentes temperaturas. ....	77
<b>Tabla 18.</b> Constantes de velocidad (k) y tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) del producto.....	77
<b>Tabla 19.</b> Cálculo para determinar el efecto de la temperatura en el HMF (con ecuación de Arrhenius). ....	78
<b>Tabla 20.</b> Percepción de juicio de defectos visuales. ....	83
<b>Tabla 21.</b> Percepción de juicio de defectos olfativos. ....	83
<b>Tabla 22.</b> Percepción de juicio de defectos gustativos. ....	85
<b>Tabla 23.</b> Percepción de juicio de defectos táctiles. ....	85
<b>Tabla 24.</b> Percepción de aromas predominantes por categoría. ....	87
<b>Tabla 25.</b> Percepción de aromas predominantes por categoría secundaria. ....	88
<b>Tabla 26.</b> Contenido y capacidad antioxidante del producto durante el almacenamiento (en 100 g de muestra). ....	90
<b>Tabla 27.</b> Bioaccesibilidad <i>in vitro</i> del alimento de diseño al inicio y final del almacenamiento. ....	94
<b>Tabla 28.</b> Peso y características urinarias (pH y volumen) de los grupos experimentales..	99
<b>Tabla 29.</b> Test urinario general de los grupos experimentales. ....	100
<b>Tabla 30.</b> Evaluación bioquímica de los grupos experimentales.....	108
<b>Tabla 31.</b> Evaluación semi-cuantitativa de las lesiones renales asociadas a litiasis.....	112

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Obtención y procesamiento de la miel (extracción hasta envasado). .....	17
<b>Figura 2.</b> Proceso de recolección, procesamiento y envasado del polen.....	17
<b>Figura 3.</b> Fases fisiopatológicas de la formación de los cálculos renales. ....	25
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de acción de compuestos con actividad antilitiásica, presentes en los productos apiaros.....	31
<b>Figura 5.</b> Diseño experimental parte I. ....	35
<b>Figura 6.</b> Diseño experimental parte II.....	35
<b>Figura 7.</b> Cambios de pH del alimento de diseño durante el almacenamiento .....	67
<b>Figura 8.</b> Acidez del alimento de diseño en el almacenamiento .....	68
<b>Figura 9.</b> Luminosidad del alimento de diseño durante el almacenamiento .....	72
<b>Figura 10.</b> Valores de $a^*$ del alimento de diseño en el almacenamiento. ....	73
<b>Figura 11.</b> Valores de $b^*$ del alimento de diseño en el almacenamiento .....	74
<b>Figura 12.</b> Valores de Chroma del alimento de diseño durante el almacenamiento .....	75
<b>Figura 13.</b> Valores de <i>hue</i> en el almacenamiento.....	76
<b>Figura 15.</b> Nivel de agrado del alimento de diseño durante el almacenamiento.....	80
<b>Figura 16.</b> Categorías generales de aceptación.....	82
<b>Figura 17.</b> Monitoreo de peso durante la prueba de toxicidad en 3 niveles de dosis. ....	96
<b>Figura 18.</b> Comparativo morfológico de riñón e hígado de ratas Wistar control y tratadas con 1000 mg/kg/día del alimento de diseño. ....	97
<b>Figura 19.</b> Análisis microscópico del sedimento urinario de los grupos experimentales en diferentes campos .....	102
<b>Figura 20.</b> Ácido úrico en orina pre y post de los grupos experimentales .....	104
<b>Figura 21.</b> Creatinina urinaria pre y post de los grupos experimentales .....	105
<b>Figura 22.</b> Urea en orina pre y post de los grupos experimentales.....	106
<b>Figura 23.</b> Análisis histopatológico renal de los grupos experimentales. ....	111
<b>Figura 24.</b> Categorías generales de aceptación (día 30,60,120 y 150).....	161

## Resumen

La urolitiasis se considera un trastorno complejo y multifactorial que deriva en la formación de un cálculo en las vías urinarias, constituyendo una de las afecciones del tracto urinario más común. Aproximadamente el 10 al 12% de la población de los países industrializados cursan con esta enfermedad, además se ha establecido la relación del calentamiento global en su incidencia y se prevé que podría alcanzar un 56% para el año 2050. Por su lado, los productos de la colmena han evidenciado efectos benéficos como coadyuvante en el tratamiento y control de la cristaluria en modelos animales. Por lo que, el objetivo del presente proyecto fue realizar la caracterización física y química de un alimento de diseño a partir de productos apiarios, así como evaluar su efecto antilitiásico en ratas Wistar, para determinar su utilización en la prevención y tratamiento de esta patología. Para ello, la materia prima (miel, polen, jalea real y propóleo) se recolectó en un apiario de Tulancingo, Hidalgo, de la empresa “ANIHU”. A cada uno de los productos apiarios se les realizó un análisis químico, el cual consistió en la determinación de ácidos fenólicos, flavonoides, ácido L-ascórbico, ácido L-dehidroascórbico, perfil de minerales y de ácidos grasos. Posteriormente, se formuló el alimento de diseño, conteniendo miel (66%), polen (25%), jalea real (2%), propóleo (0.1%), alcohol de caña (2.55%), y el resto en otros componentes, como agua, caramelo artificial y extracto de roble (4.35%). Se analizó la estabilidad del producto durante 180 días, considerando parámetros fisicoquímicos, cinéticos, sensoriales, contenido y capacidad antioxidante. A su vez, se estudió la bioaccesibilidad intestinal *in vitro* de los compuestos antioxidantes y capacidad antioxidante durante el almacenamiento. En una segunda fase, se evaluó la seguridad del producto mediante la  $DL_{50}$  y el efecto antilitiásico en un modelo de litiasis en ratas Wistar. De acuerdo con los resultados, el propóleo y el polen proporcionan el mayor contenido de flavonoides, ácido ferúlico y ácido L-ascórbico y L-dehidroascórbico. En cuanto al perfil de minerales, la concentración de potasio y magnesio en el polen fue elevada, los cuales se caracterizan por el efecto inhibitorio de la litiasis renal. En cuanto al perfil de ácidos grasos, se identificó el ácido palmítico como principal componente, presente en propóleo y polen.

Por otro lado, se observó que, durante el almacenamiento del producto, sobre todo a 37°C, se presentó un aumento del hidroximetilfurfural (HMF), lo que ocasionó cambios en los parámetros de color. El tiempo de vida media del producto fue de 29.81 a 4°C, 14.57 para 24°C y de 0.23 días a 37°C. Con respecto al análisis sensorial, se encontró que la aceptación general durante el almacenamiento mejoró proporcionalmente al paso del tiempo, presentando menor apreciación de defectos gustativos, además, se identificaron como aromas predominantes los afrutados, florales y caldo. En la capacidad antioxidante, hubo un aumento en el ensayo DPPH<sup>+</sup>, 34.87% en ABTS<sup>•+</sup>, 33.86% en FRAP y un decremento del 4% de la actividad quelante, contrastando el día 1 con el 180.

En la bioaccesibilidad *in vitro*, también se detectó un incremento en el contenido fenólico total, capacidad antioxidante por ABTS<sup>•+</sup>, FRAP y actividad quelante. En el modelo de toxicidad (DL<sub>50</sub>), no se detectaron alteraciones en peso, muerte o daño en órganos en los animales de experimentación hasta una dosis máxima de 1000 mg/kg. Finalmente, al analizar el efecto en el modelo de litiasis, la administración del AD (alimento de diseño), disminuyó significativamente los valores urinarios y séricos de ácido úrico y urea, sin manifestar incremento en los niveles de glucosa. Mediante la observación histológica se demostró que el etilenglicol (EG) causaba daño renal agudo y signos aparentes de depósitos de oxalato de calcio confirmados mediante luz polarizada y tinción con hematoxilina y eosina (H&E). El AD fue eficaz para revertir la litiasis, degeneración renal, inflamación y necrosis, todo esto contrastado mediante tinción, luz polarizada y a través de una escala patológica semi-cuantitativa de las lesiones renales asociadas a litiasis. Los resultados evidencian que el producto tiene potencial como coadyuvante en el tratamiento y control de la litiasis renal, alto valor nutricional, seguridad al consumo y una moderada estabilidad en sus propiedades antioxidantes y contenido de antioxidantes frente al almacenamiento; por lo que se propone como una alternativa coadyuvante eficaz que permite disminuir las complicaciones en pacientes con dicho padecimiento.

**Palabras clave:** nefrolitiasis, productos apiaros, efecto antilitiásico, alimento de diseño.

## Abstract

Urolithiasis is a complex and multifactorial disorder that leads to the formation of a stone in the urinary tract, constituting one of the most common urinary disorders with a considerable increase, especially in industrialized and developing countries. Approximately, 10 to 12% of the population of industrialized countries will suffer from this disease, furthermore, the relationship between global warming in its incidence has been established and it is expected that it could reach 56% by the year 2050. On the other hand, the products of the beehive have shown beneficial effects as an adjuvant in the treatment and control of crystalluria in animal models. Therefore, the objective of this project was to carry out the physical and chemical characterization of a designer food from apiary products, as well as to evaluate its antiurolytic effect on a model of lithiasis in Wistar rats, to determine its use in the prevention and treatment of this pathology. For this, the raw materials (honey, pollen, royal jelly and propolis) were collected in an apiary in Tulancingo, Hidalgo, from the company “ANIHU”. A chemical analysis was carried out on each of the apiary products, which consisted of the determination of phenolic acids, flavonoids, L-ascorbic acid, L-dehydroascorbic acid, mineral and fatty acid profile. Later, the product was formulated, containing honey (66%), pollen (25%), royal jelly (2%), propolis (0.1%), cane alcohol (2.55%), and the rest in other components, such as water, artificial caramel and oak extract (4.35%). The stability of the product was analyzed considering physicochemical, kinetic, sensory, and antioxidant parameters. In turn, the *in vitro* intestinal bioaccessibility of antioxidant compounds and antioxidant activity during storage were studied. In the second phase, the safety of the product was evaluated through LD<sub>50</sub> and the antiurolithic effect in a lithiasis model in Wistar rats. According to the results, propolis and pollen provide the highest content of flavonoids, ferulic acid and L-ascorbic and L-dehydroascorbic acid. Regarding the mineral profile, the concentration of potassium and magnesium in the pollen was high. In relation to fatty acid profile, palmitic acid was identified as the main one, present in propolis and pollen. On the other hand, it was observed during storage of the design product, especially at 37°C, an increase in hydroxymethylfurfural (HMF), caused an effect on the color. The half-life time of the product was 29.81 days at 4°C, 14.57 for 24°C and 0.23 days at 37°C. With respect to the sensory analysis, it was found that general acceptance during storage improved proportionally with the passage of time, presenting less appreciation of taste defects. In

addition, fruity, floral and brothy aromas were identified as predominant. In the antioxidant capacity, there was an increase in the DPPH<sup>•+</sup> assay, 34.87% in ABTS<sup>•+</sup>, 33.86% in FRAP and a decrease of 4% in chelating activity, contrasting day 1 with day 180. Similar effect was found *in vitro* bioaccessibility, in ABTS<sup>•+</sup> and FRAP assay and chelating activity. In the toxicity model (LD<sub>50</sub>), no changes in weight, death, or organ damage were detected in experimental animals up to a maximum dose of 1000 mg/kg. Finally, when analyzing the effect in the lithiasis model, the administration of AD (designer food) significantly decreased the urinary and serum values of uric acid and urea, without manifesting an increase in glucose levels. Ethylene glycol (EG) was shown to cause acute renal damage by histological observation and apparent signs of calcium oxalate deposits confirmed by polarized light and with hematoxylin and eosin (H&E) staining. The AD was effective in reversing lithiasis, renal degeneration, inflammation, and necrosis, all contrasted by staining, polarized light, and through a semi-quantitative pathological scale of renal lesions associated with lithiasis. The results show that the product has potential as an adjuvant in the treatment and control of renal lithiasis, has high nutritional value, safety for consumption, and moderate stability in its antioxidant properties and antioxidant content when stored; therefore, it is proposed as a food that reduces complications in patients with said condition.

Keywords: nephrolithiasis, apiary products, antiurolithic effect, designer food.



## 1. INTRODUCCIÓN

Las lesiones renales agudas y crónicas constituyen problemas de salud pública que conllevan a altos costos de la atención médica y a una calidad de vida disminuida en la población que lo padece (1,2). Los cálculos renales se consideran el tercer trastorno más común dentro de las enfermedades urinarias, con una tasa de recaída del 50% en 5 a 10 años (3), además aproximadamente el 10 al 12% de la población de países industrializados tendrán al menos un cálculo en su vida (4). La literatura sugiere que la alimentación y algunos factores ambientales, están asociados con el riesgo de cálculos, entre ellos el sobrepeso, la obesidad (5), la ingesta de líquidos insuficiente (6) y el estilo de alimentación (consumo poco frecuente de verduras, frutas y lácteos bajos en grasa) (7). De este modo, se establece que una ingesta regular de frutas y verduras (8,9), así como un menor consumo de proteínas de origen animal (10), favorece al aumento del pH, del volumen urinario y de los inhibidores como citrato, potasio y magnesio, los cuales desempeñan un papel importante en su prevención (11).

Los productos apíarios son una alternativa para el abordaje de diversas alteraciones, entre ellas las relacionadas a la salud renal al exhibir un efecto antiinflamatorio (12), nefroprotector (13), eficacia en el tratamiento y prevención de la cristaluria (14), aumento en la producción de orina (15,16), entre otras. En respuesta a los efectos secundarios que traen consigo el abordaje médico de esta enfermedad asociadas a las técnicas quirúrgicas invasivas y las opciones limitadas de tratamiento, es necesario el establecimiento de alternativas coadyuvantes. Por tanto, un alimento de diseño elaborado a partir de productos apíarios, proporcionaría evidencia sobre nuevas terapias complementarias para su manejo, por lo que el presente proyecto explorará el efecto nefroprotector y antilitiásico de un alimento de diseño de productos de la colmena en un modelo *in vivo*.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Apicultura y obtención de los productos apiarios**

La apicultura es una rama de la agricultura y actividad económica, que se refiere a la ciencia y arte de criar y cuidar a las abejas para explotar sus productos, ha sido practicada desde el tiempo de civilizaciones antiguas (griegos y romanos), no obstante, sus procesos han ido cambiando a lo largo del tiempo por medio de la implementación de máquinas y utensilios que han facilitado y hecho más sencillo el proceso de obtención de los subproductos de la colmena (miel, polen, jalea real y propóleo) (17).

A continuación, se describirán los métodos de obtención y la composición, de los productos apiarios, como constituyentes del alimento de diseño.

### **2.2. Miel**

La miel es el principal alimento producido por las abejas, que deriva del proceso digestivo del néctar de las flores (18). El proceso de obtención implica una serie de pasos que tienen como finalidad la eliminación de las trazas de polen, cera y otros materiales indeseables. Las dos etapas importantes del procesamiento son la filtración y el calentamiento (19).

La filtración implica precalentamiento a 40°C, colado, clarificación y finalmente un calentamiento indirecto a 60-65°C, por un tiempo de 25-30 minutos, seguido de un enfriamiento rápido, permitiendo el mantenimiento de sus características de color, sabor, enzimas y otras sustancias biológicas (20). Por su parte, el calentamiento se considera un método de purificación, realizado con temperaturas controladas. Esta fase contribuye a la disminución de la humedad y a la destrucción de células de levaduras que pudieran estar presentes e incluye un doble tratamiento térmico, uno por 24 h a 50°C, para fomentar la destrucción de los cristales (se conoce también como pasteurización estándar) (21) y otro a 75°C, ello permite prevenir el deterioro de la calidad de la miel (22). Posteriormente, se enfría y se envasa. La Figura 1, representa un resumen de las etapas del procesamiento de la miel.

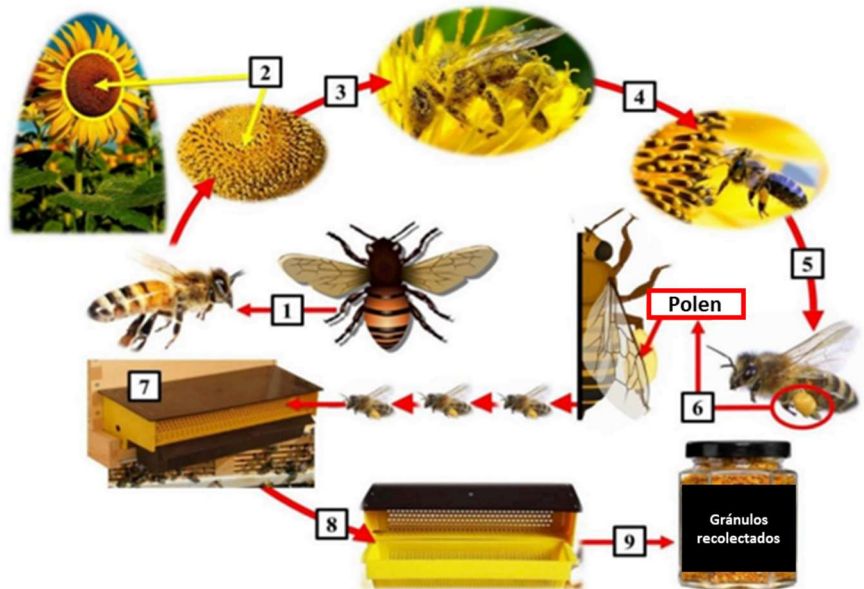


**Figura 1.** Obtención y procesamiento de la miel (extracción hasta envasado).

### 2.3. Polen

El polen es la parte reproductora masculina de las plantas y es recolectado para las abejas en crecimiento. Se considera un alimento natural completo, ya que contiene casi todos los nutrientes necesarios para la abeja, con un alto contenido de fitoquímicos (23).

Su proceso inicia con la recolección de los gránulos de las plantas (24), los cuales se aglutinan en sus patas y se combinan con sus secreciones salivales formando un grano de un tamaño de entre 1.4 a 4 mm (25). El apicultor finalmente lo recolecta con la ayuda de una trampa fijada a la entrada de las colmenas o panales, en donde al momento de que ingresan las abejas el polen cae de sus patas en una bandeja (26) (Figura 2).



**Figura 2.** Proceso de recolección, procesamiento y envasado del polen. Paso: 1-4, recolección de los gránulos de polen; 5-6, aglutinación de los gránulos; 7-8, obtención del polen por el apicultor. **Fuente:** (26).

## **2.4. Jalea real**

La jalea real es una secreción espesa y lechosa, producida por las mucosas glandulares hipofaríngeas y mandibulares de las abejas que sirve como alimento de las larvas (27). La abeja reina es alimentada con ella durante todo su período larvario, de ahí su nombre de “jalea real” (28).

Para su comercialización y cosecha a gran escala, los apicultores transfieren o injertan larvas jóvenes de aproximadamente 1 día de edad en celdas de abejas reinas artificiales, de modo que se induce a que las abejas nodrizas puedan abastecer constantemente la celda con este producto (29). El tiempo promedio para la cosecha es de 3 días (72 h), no obstante, actualmente los productores emplean modificaciones a este método en un tiempo reducido a 24-48 h, encontrando que se producen cantidades similares de jalea real, sin embargo, esta modificación en el proceso puede ocasionar cambios en los parámetros fisicoquímicos (30).

## **2.5. Propóleo**

El propóleo es una sustancia resinosa, compacta y moldeable recolectado por las abejas forasteras (*Apis mellifera* L.) que deriva de brotes y tejidos de plantas, después de mezclarlos con cera y polen (31). Dentro del panal, las abejas lo emplean para sellar las grietas, mantener la humedad y temperatura estable de la colmena (32).

El método de obtención parte de la instalación de pantallas o paneles con pequeños agujeros que simulan grietas en las paredes de la colmena, de esta forma, por naturaleza las abejas intentan sellar los agujeros y llenar la trampa con propóleo, una vez recolectado, se retira de las trampas enfriando las láminas de plástico, finalmente se puede extraer doblando o cepillando las láminas (33).

Otra técnica la constituye la implementación de un marco colector de madera, que se coloca en la colmena para estimular a las abejas a cubrir esa “grieta” (34).

## **2.6. Producción de miel**

De la gran diversidad de los productos apiaros, solo se cuentan con datos estadísticas de producción de la miel en las diferentes escalas (mundial, nacional y estatal), las cuales se describirán a continuación.

De acuerdo con Soto-Muciño (35), se establece en el orden de 1.1 millones de toneladas, donde los países de China, Turquía, Estados Unidos, Argentina, Ucrania y México, concentran la mayor producción (Tabla 1).

**Tabla 1.** Producción (ton/año) de principales productores de miel a nivel mundial del 2000 al 2015

Año	China	Turquía	EUA	Argentina	Ucrania	México
2010	409,149	81,115	80,042	59,000	70,873	55,684
2011	431,907	94,245	67,294	74,000	70,300	57,783
2012	436,000	88,162	66,720	75,500	70,134	58,602
2013	466,300	94,694	83,000	78,000	73,713	56,906
2014	468,000	102,486	84,500	79,500	74,000	60,624
2015	469,000	103,000	86,007	80,000	74,100	61,881

Fuente: (35)

En 2019, México produjo alrededor de 61,986 toneladas (36), hecho que lo posicionó en noveno lugar a nivel mundial, además se tiene un registro de 43 mil productores que suman aproximadamente 1.9 millones de colmenas (37).

El principal destino de la miel mexicana es la Unión Europea (UE) y algunas Naciones de Centro América (35) y está representada por Campeche, Chiapas, Jalisco, Veracruz, Oaxaca, Quintana Roo y Yucatán, siendo este último el líder en producción, cuyo volumen promedio anual asciende a 9,810 toneladas (Tabla 2) (36).

**Tabla 2.** Principales estados productores a nivel nacional en 2019

Estado	Producción por año (toneladas)
Yucatán	9810
Campeche	7520
Jalisco	5948
Chiapas	5500
Veracruz	4798
Oaxaca	4668
Quintana Roo	3255
Puebla	2477
Michoacán	2037
Guerrero	2029
Zacatecas	2009
Morelos	1928
Hidalgo	1358
San Luis Potosí	1126
México	929
Tlaxcala	748

Fuente: (36)

En el estado de Hidalgo, la producción de miel se encuentra en el rango de 1100-1200 toneladas de miel por año, cantidad que representa el 1.4% de la producción nacional. De este total, la zona de la Huasteca es la región apícola más importante (corresponde el 48% de la producción estatal), con 8343 colmenas que producen 370.7 toneladas/año (38). Tulancingo especialmente, de acuerdo con los datos referidos en el “Anuario Estadístico de la Producción, 2019” del SIAP, el municipio se situó en el lugar 12 de un total de 67 municipios productores (Tabla 3) (39).

**Tabla 3.** Producción de miel en Hidalgo

Lugar	Municipio	Producción (toneladas)
1	San Felipe Orizatlán	427
2	Huejutla de Reyes	229
3	Xochiatipan	164
4	Villa de Tezontepec	54
5	Atlapexco	51
6	Huehuetla	44
7	Huautla	43
8	Calnali	32
9	Tlanchinol	28
10	Jaltocán	28
11	Yahualica	20
12	Tulancingo	18
13	Tepehuacán	17
14	San Bartolo Tutotepec	15
15	Huazalingo	15
16	Tlahuiltepa	12
17	Huichapan	11
18	Lolotla	9
19	Atotonilco el Grande	7
20	El Oxochitlán	7
Total		1357

Fuente: modificado de SIAP (39).

### **2.7. Caracterización de los productos apiarios**

Múltiples investigaciones han dedicado esfuerzos al análisis de las propiedades y composición de los productos apiarios, con la finalidad de conocer sus propiedades fisicoquímicas y funcionales, pues se sabe que todo producto natural más allá de su

composición nutrimental contiene compuestos bioactivos, que se asocian al mejoramiento del estado de salud, debido a su actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antiproliferativa y modulación de la transducción de señales que le confieren estos compuestos a los alimentos (40–42).

Los productos apiarios se consideran una buena fuente de compuestos antioxidantes, los cuales se han hecho notar en cuanto a su variabilidad e importancia desde el punto de vista de la salud que, en conjunto con sus atributos nutrimentales, resultan ser una valiosa alternativa como ingrediente en los alimentos de diseño. En la Tabla 4, se resumen las principales características de la miel, polen, jalea real y propóleo.

## **2.8. Nefrolitiasis o litiasis renal**

La litiasis renal es una enfermedad frecuente cuya prevalencia ha aumentado en los últimos años, relacionada a insuficiencia renal (2-3% insuficiencia renal terminal), obesidad, hipertensión arterial, hiperuricemia, hipercolesterolemia e hiperparatiroidismo primario (43,44).

Entre los factores de riesgo no patológicos se encuentra: el clima, habiéndose puesto de manifiesto una asociación entre zonas geográficas con temperaturas elevadas, debido a un mayor riesgo de deshidratación con la consiguiente oliguria relativa, que conlleva sobresaturación urinaria y otras causas también son una dieta rica en grasas saturadas, proteínas animales y sodio (45).

En general, se sugiere que las placas de Randall son el origen de esta enfermedad, ya que actúan un centro de distribución de los cristales de oxalato que se depositan en las membranas basales del asa de Henle formada de una amplia matriz orgánica que conduce a la formación de los cálculos (46). La calcificación de la placa ocasiona la expresión de moléculas en los túbulos renales que actúan como sitios de unión (por ejemplo, fosfatidilserina y osteopontina) (47,48), ejerciendo el inicio de la producción de oxalato de calcio (CaOx) (49).



**Tabla 4.** Características nutricionales y químicas de los productos apiaros

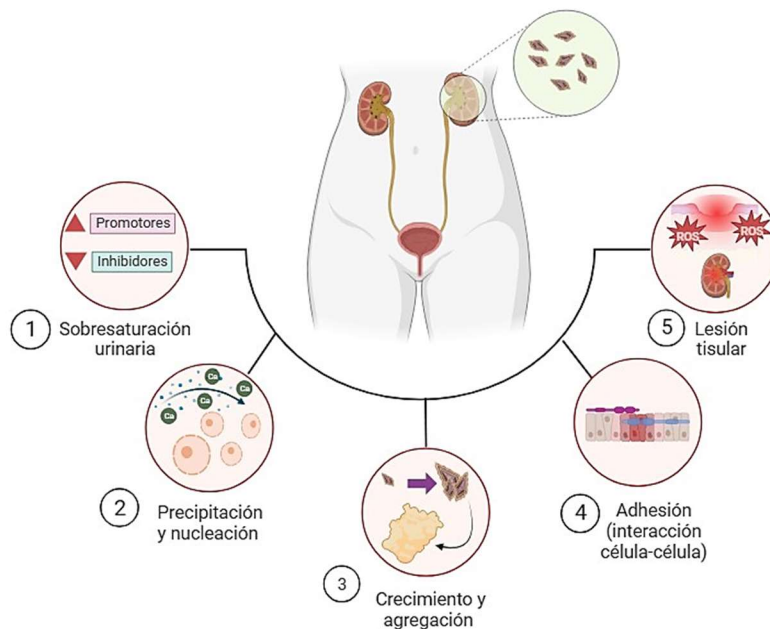
Componente	Miel	Polen	Jalea real fresca	Propóleo
Carbohidratos	80% (50)	64-81% (50)	7-18% (51)	26-64% (52)
Proteínas	0.1-1.15 (50)	5-60% (53)	9-18% (51)	2-3% (52)
Lípidos y ácidos grasos	NR	*4-7% (53) *Ácidos grasos: ácido caprílico, palmítico, esteárico, oleico, linolénico, mirístico, araquídico, pentadecaonico, behenico, heptadecanoico (54)	* 3-8% (51,55) * Ácidos grasos, el 32% representa el ácido graso: 10-hidroxi-2-decenoico (56)	*38.67-61.64% (52) *Ácidos grasos: ácido undecanoico; palmítico, heptadecanoico, esteárico, butírico, caprílico, mirístico, ácido araquídico, tridecanoico, laúrico, palmitoleico; oleico, linoleico, $\gamma$ -linolénico, $\alpha$ -linolénico (57)
Minerales	0.04-2%, K y otros minoritarios como el Ba, Sr, Cr, Ni, Cd, Sn, Sb, Tl, P, S, Ca, Mg, K, Na, Zn, Cu y Mn (50)	1.5% (58), Ca, Mg, Fe, Zn, Cu (55)	1.5% (51), K, Na, Mg, Zn, Fe, Cu, Mn (56)	K, Ca, K, Mg, Al, Br, Cr, Fe, Mn, Ni, Sr, Zn, As, Cd y Pb (59)
Fibra	NR	0.3-20% (53)	NR	NR
Ácidos orgánicos	Glucónico (representa entre el 64.6-99.8%), también tartárico, málico y cítrico (60)	Ácido cítrico, málico, fumárico, malónico u otros glucónico y láctico (61)	Ácido siquímico, propiónico, láctico, málico, malónico (62)	Ácido benzoico y sus derivados (63)
Fitoesteroles	NR	1.1% (53)	NR	NR
Fosfolípidos	NR	1.5% (53)	80-85% de los lípidos (con los ácidos grasos, ceras y esteroides) (51,55)	NR
Ácidos fenólicos y flavonoides	*Apigenina, crisina, luteolina, quercetina, miricetina, ácido vanílico, ácido protocaldehído, ácido cafeico, ácido gálico, kaempferol (64,65)	*Flavonoides representan (3-8% (53) * Ácido protocatecuico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, isoharmetina, kaempferol, luteolina, apigenina, naringenina, acetina, galangina y quercetina (65)	*4-10% (51) * Pinobanksina uno de los principales (66)	*Apigenina, crisina, kaempferol, miricetina, naringenina, pinocembrina, quercetina, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cinámico, ácido clorogénico y ácido vanílico (67)

El mecanismo fisicoquímico también está influenciado por la sobresaturación y cristalización urinaria (68), así como en las modificaciones en la relación entre receptores, promotores y moléculas con acción inhibitoria (69). La sobresaturación ocasiona que los solutos precipiten en la orina conduciendo a la nucleación y formación de los cristales (70), caracterizada por la aparición de un núcleo que recibe el nombre de nidus (71), durante este proceso los iones comienzan a agruparse microscópicamente volviéndose insolubles (72), dando lugar a varios centros de nucleación (pueden ser células epiteliales, glóbulos rojos y cilindros urinarios) (73). La siguiente etapa, se caracteriza por el crecimiento de los cálculos causado por la agregación continua de los cristales preformados (74), que conllevan a un aumento de la energía superficial (72). Después, comienza a formarse una masa dura, dando como resultado una piedra o lito, este proceso recibe el nombre de “agregación” (73).

La siguiente etapa, recibe el nombre de “retención de cristales” o también llamada “interacción cristal-célula” que consiste en la adhesión de los cristales con el revestimiento del túbulo renal (75), dicho proceso ocasiona el movimiento de los cristales hasta la membrana basal del riñón (76), lesionando los tejidos y promoviendo que los macrófagos y lisosomas trabajen constantemente para eliminar los cristales en la orina (77). En consecuencia, se produce liberación de protrombina renal y proteínas aniónicas, induciendo aglomeración (78), en donde también se establece que las especies reactivas de oxígeno son un factor implicado en este proceso (79). Finalmente, los depósitos de cristales pueden aumentar la síntesis y expresión de macromoléculas pro-inflamatorias, así como retención de partículas en la superficie papilar renal (80). Este mecanismo previamente descrito, se sintetiza en la Figura 3.

En cuanto a la epidemiología, se estima una prevalencia en América de entre 2 y 20%, cuyo mayor intervalo de edad donde se presenta es en la tercera y sexta década de la vida (81,82). Algunos estudios han reflejado la progresión de esta patología, de los cuales uno de los más reconocidos es el que se llevó a cabo con la base de datos del National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), donde se observó un incremento en la prevalencia del 3.8% en el NHANES I (1976 a 1980) al 8.8% en el NHANES III (2007-2010) (83). A su vez, un modelo predictivo abordan la relación que pudiera tener el calentamiento

global en la incidencia en países desarrollados, previendo que esta enfermedad pudiera alcanzar un 56 % para el año 2050 (84).



Created in BioRender.com 

**Figura 3.** Fases fisiopatológicas de la formación de los cálculos renales. La sobresaturación urinaria comienza debido al aumento de los promotores y decremento de los inhibidores, generando sobresaturación urinaria, esta modificación promueve la precipitación de los promotores (iones calcio, entre otros), ocasionando la formación de centros de nucleación. Posteriormente, el cristal de oxalato continúa creciendo con las subsecuentes agregaciones de los cristales. Finalmente, la masa formada de un tamaño mayor, se adhiere al túbulo renal y los tejidos se lesionan por el incremento en la síntesis de moléculas pro-inflamatorias.

En México, la información es escasa debido a la falta de registros en los centros de salud y por la propia naturaleza de la enfermedad. La fuente más empleada son los ingresos hospitalarios (82), además de que han sido pocos los estudios epidemiológicos sobre esta enfermedad. En el año 1984 el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), mediante una encuesta nacional, reportó una prevalencia de 2.4 casos por 10,000 derechohabientes, encontrando la mayor cantidad de casos en los estados de Yucatán, Puebla y Quintana Roo, este último con 5.8 casos por cada 10,000 derechohabientes, sin embargo, se espera que con base a esta falta de registro epidemiológico, se carezca de una proyección real sobre el número de pacientes que la padecen (85).

Por otro lado, en cuanto a la evaluación clínica del paciente, junto con el análisis del cálculo, se realiza un estudio bioquímico que consiste en un examen sanguíneo para determinar los niveles de azoados (creatinina, ácido úrico, urea), calcio, glucosa, una valoración urinaria (orina de 24 horas), para conocer el volumen de diuresis, así como la presencia de algunos elementos como creatinina, urea, sodio, calcio, ácido úrico urinarios, en algunos casos incluso se incluye una prueba de orina de la mañana en donde se analiza el pH, densidad urinaria y valoración citobacteriológica (86), todo ello para revelar factores de riesgo urinarios como la hipercalciuria, hiperuricosuria, entre otros (87).

Una vez establecido el diagnóstico, el tratamiento consiste en la reducción de los indicadores alterados, con los consiguientes cambios en el estilo de vida, en el ámbito médico, uno de los fármacos empleados son las tiazidas, las cuales han demostrado su efectividad en ensayos clínicos para contrarrestar los niveles altos de calcio (88), no obstante, su consumo regular conduce a hipopotasemia, riesgo de hipotensión, intolerancia a la glucosa y en algunos casos disfunción eréctil (87). Otro de los fármacos son los citratos, administrados para limitar el crecimiento de los cristales, actúan principalmente sobre la reducción de la agregación del mismo en los túbulos renales (89), también genera un decremento de la sobresaturación de la orina, a través del secuestro de iones de calcio, produciendo una modificación del pH de la orina (siendo alrededor de 6.0) (90), sin embargo, se ha establecido que su ingestión regular tiene efectos sobre los niveles séricos de potasio y enzimas hepáticas (91).

Por otro lado, existe evidencia del empleo de alimentos funcionales o productos naturales con efecto coadyuvante en el tratamiento de la nefrolitiasis, algunos de ellos, se detallan enseguida.

## **2.9. Evaluación de las propiedades funcionales y del efecto antilitiásico de alimentos funcionales y productos de la colmena en modelos *in vitro* e *in vivo*.**

La evaluación *in vitro* de las condiciones fisiológicas de la digestión, por medio del ensayo de bioaccesibilidad tiene buena correlación con la eficacia de la absorción de los nutrientes ingeridos y su utilización metabólica, se aplica a alimentos o aislados de compuestos bioactivos, comprendiendo la determinación del componente o diálisis de

sustancias solubles, a través de una membrana semipermeable (método de diálisis) que se complementa con modificaciones graduales en el pH y las enzimas, simulando así mejor la situación real (método dinámico) (92), no obstante es necesario complementar este acercamiento con metodologías *in vivo* (93).

Aun cuando los estudios de bioaccesibilidad en los productos de las abejas son limitados, algunos de ellos han reportado un incremento de los compuestos fenólicos (94). Mientras que en otro estudio demostró que la capacidad antioxidante disminuye entre 12.39%-13.67% y los compuestos fenólicos entre 1.5-3% aproximadamente (95).

En polen, se ha evidenciado una tendencia decreciente de los compuestos fenólicos después de la digestión gastrointestinal *in vitro*, debido a las condiciones gástricas (96,97). Además, se ha descrito que la forma de almacenamiento influye considerablemente, de modo que una comparación de polen envasado y no envasado arrojó resultados que indican que aquellas que se protegían con un envase adecuado exhibieron cifras significativamente mayores (98).

En propóleo, se ha reportado que existe una reducción considerable de los compuestos fenólicos de hasta 91% post digestión gástrica *in vitro* (99). Otro estudio refiere que durante la simulación de digestión, se encontró un aumento en el contenido de flavonoides entre la fase oral y la fase gástrica, con porcentajes de recuperación de los compuestos de aproximadamente del 13% (100).

Otra de las características que debe valorarse es la seguridad de los alimentos, de modo que, no sólo contribuyan al mejoramiento de la salud, sino que además su consumo sea seguro, por tanto, la evaluación de la seguridad es una fase primordial en la caracterización de cualquier producto o alimento, ello se abordará en el apartado siguiente.

Escasos estudios han informado sobre la toxicidad de algunos productos apiarios. Los disponibles asientan que la jalea real es segura en dosis de hasta 5000 mg/kg/día, al no encontrar modificaciones orgánicas o metabólicas después de su consumo (101). Por otro lado, una formulación que contenía como ingredientes principales propóleo, veneno de abeja y jalea real en dosis única de 2000 y 5000 mg/kg/día evidenció hallazgos similares (102).

Finalmente, con respecto a la evaluación del efecto antilitiásico, existe una amplia variedad de estudios, no obstante, el modelo de inducción *in vivo* en ratas es el más común, mediante el empleo de etilenglicol al 0.75-1%, administrado diariamente en el agua de beber (103–106) o bien en combinación con cloruro de amonio (107–109).

En cuanto a los alimentos utilizados se encuentran los extractos acuosos y hojas de preparaciones a base de plantas (103,104,106,108,110–115). También se ha probado el efecto de algunas frutas, como la granada (116), jugo de limón (117), cereza silvestre (118), escaramujos (119) y algunas semillas (120–122).

Los productos apiaris también han sido motivo de análisis para esta enfermedad (litiasis), El-Menyiy et al. (123), identificaron el efecto protector del extracto de propóleo sobre la nefrotoxicidad y la hepatotoxicidad inducida por etilenglicol en ratas, estableciendo que la administración en ambas dosificaciones (100 y 250 mg/kg/día) produjeron normalización de los niveles sanguíneos de creatinina, sodio y potasio.

Así mismo Aksoy (124) en un modelo de daño renal, también con exposición a etilenglicol con la administración de jalea real durante 15 días, fue capaz de reducir los niveles del BUN, creatinina y una cantidad de eritrocitos malonaldehído menor al contrastarlo con el grupo dañado, además de observar un mejoramiento de las catalasas en el tejido renal y en plasma para los grupos tratados. Aslan y Aksoy (12), establecieron el efecto antiinflamatorio de la administración jalea real en un modelo de inflamación en ratas con el uso de etilenglicol, obteniendo como resultado una modificación a beneficio de las IL-1 $\beta$  e IL-18, tanto en plasma como en los tejidos renales de los animales, así como mejoramiento del Balance Urea Nitrógeno (BUN) y creatinina.

El-Guendouz et al. (15), evaluaron el efecto diurético y el mejoramiento de electrolitos séricos en ratas con la administración de miel durante 21 días, obteniendo que la miel y la miel con propóleo (1000 mg/kg y 100 mg/kg, respectivamente), generaba mayor volumen urinario de 4.25 mL en el día “cero” a 11.50 mL en el día 21 para el primer caso y de 6 mL (día cero) a 8 mL (día 21) en la administración conjunta.

Narter (14), identificó el efecto protector y terapéutico del propóleo en la hiperoxaluria en un modelo de nefrolitiasis (con etilenglicol) y comparó con verapamilo, a dosis de 50 mg y 100 mg/kg para propóleo y 1 mg/kg del fármaco durante 28 días, exhibiendo que su administración resultaba efectiva para la formación de cristales de oxalato, siendo más eficaz que el medicamento en la prevención de la lesión renal.

Igualmente, Imtara et al. (125), con objeto de examinar el efecto de la administración durante 3 días de miel en ratones con 100 mg/kg, para el grupo intervenido con miel y 10 mg/kg de furosemida con una recolección urinaria (1, 2, 4, 6 y 24 horas después de la administración), con la determinación de los niveles séricos de sodio, cloro, ácido úrico, creatinina urinaria al día 11. Este trabajo puso de manifiesto el mejoramiento en el volumen urinario de 24 horas comparado con el agua y similar al de la furosemida, además de un aumento en el aclaramiento de creatinina (filtración glomerular), sodio y cloruro sin causar hipocalcemia ni afectar el nivel de urea, ácido úrico y creatinina en sangre.

Por otra parte, la evidencia sugiere que los productos apiaros contienen una amplia gama de compuestos como el magnesio, vitamina C, ácido  $\alpha$ -lipoico, ácido cafeico y ácido ferúlico, repercuten favorablemente en esta patología (Figura 4). Los mecanismos de acción de estos compuestos son los siguientes:

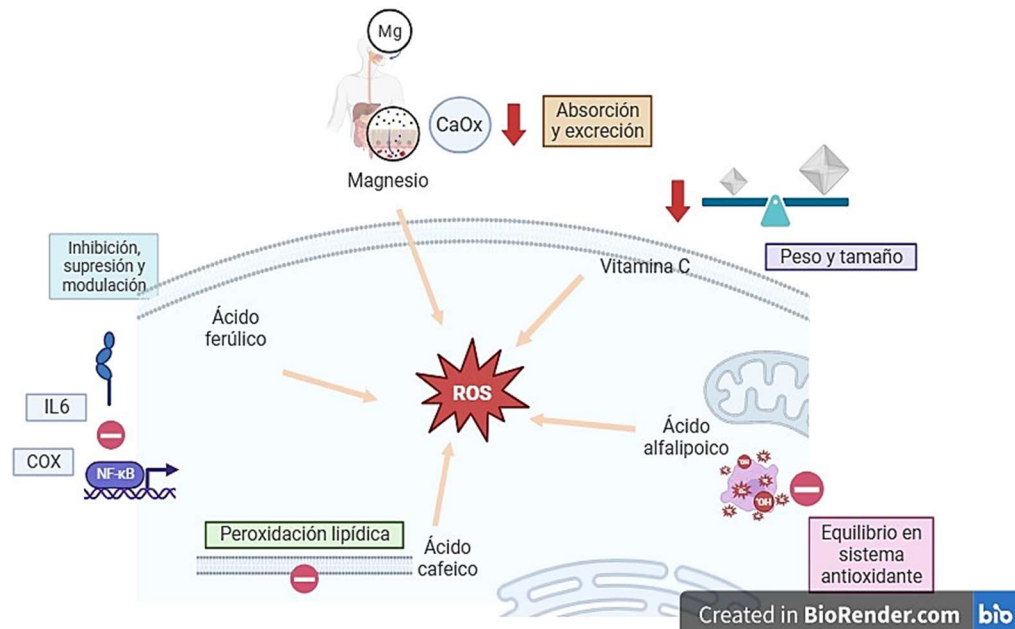
- Magnesio: En personas sanas, la absorción intestinal de magnesio y la excreción renal está mediada por la filtración y reabsorción (126). Este mineral se considera un agente inhibidor de la nefrolitiasis al actuar disminuyendo la absorción intestinal y excreción de oxalato (127), además se ha encontrado una asociación entre la ingesta de magnesio y un menor riesgo en la sobreproducción y cristalización del oxalato, impactando favorablemente para prevenir la formación de cálculos (123,128). Por lo consiguiente, este mineral se constituye como una alternativa en el tratamiento y/o prevención de los cálculos (129). También se ha combinado con fitatos encontrando un efecto sinérgico para retrasar la formación excesiva de oxalato de calcio (130).
- Vitamina C. Manzoor et al. (131) informaron su papel sobre la cristalización y patogénesis en la formación de cristales de estruvita, exhibiendo que esta vitamina genera una disminución del tamaño y peso del cálculo, mismo que puede estar

explicado a la naturaleza ácida del micronutriente, retrasando la velocidad de crecimiento del cálculo, por ello, algunas frutas cítricas con buen aporte han sido sugeridas para generar un efecto inhibitorio de la nefrolitiasis.

- **Ácido  $\alpha$ -lipoico.** Es ampliamente conocido por su capacidad para prevenir o contrarrestar la producción de especies reactivas de oxígeno, en especial el óxido nítrico, radicales hidroxilo y anión superóxido (132,133). De acuerdo con algunas investigaciones, ha demostrado tener efectos benéficos sobre un modelo de cistinuria en ratones, en el mejoramiento del funcionamiento renal y los cambios histopatológicos, sugiriendo pudiera estar relacionado con aumento en la eficacia de la actividad de las enzimas antioxidantes (134–137). Si bien, su mecanismo de acción específico permanece desconocido, se propone que la nefroprotección está mediada por la inhibición en la infiltración de neutrófilos, regulando así los factores proinflamatorios y generando un equilibrio oxidante-antioxidante (138).
- **Ácido cafeico.** Varios autores han encontrado que este compuesto, está presente principalmente en el propóleo y en los productos de la colmena en general, suprime la peroxidación lipídica inducida por el daño renal (139,140), previene la formación de cálculos por su acción antiinflamatoria e inhibición de la xantina oxidasa (14). También está relacionado con el mejoramiento del daño renal, al bloquear la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (141). Finalmente, también han descrito un impacto favorable en los niveles de óxido nítrico, nitrógeno ureico y creatinina (142).



- **Ácido ferúlico.** Este compuesto fenólico ha exhibido efectos protectores en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino, mediante su actividad antiinflamatoria, modulando la producción de citoquinas proinflamatorias (IL6), suprimiendo la sobreproducción de COX-2 y mediando la producción del factor nuclear kappa b (NF- $\kappa$  $\beta$ ) (143–145).



**Figura 4.** Mecanismo de acción de compuestos con actividad antilitiásica presentes en los productos apícolas. Magnesio; disminuye la absorción intestinal y excreción del oxalato. Vitamina C: reduce el peso y tamaño de los cristales (principalmente los de estruvita. Ácido alfalipoico: actúa como nefroprotector a través de la inhibición de la infiltración de neutrófilos y de especies reactivas de oxígeno, mejoramiento de las enzimas antioxidantes, generando equilibrio en el sistema antioxidante. Ácido cafeico: suprime la peroxidación lipídica y bloquea la producción excesiva de ROS. Ácido ferúlico: provee nefroprotección mediante la modulación de citoquinas proinflamatorias y otros componentes.

En definitiva, los productos naturales entre ellos los productos de la colmena constituyen una alternativa coadyuvante en las alteraciones renales, con fundamento en lo anteriormente mencionado, en consecuencia, el diseño de un alimento a base de estos ingredientes constituirá una opción interesante para la industria alimentaria.

## 2.10. Alimento de diseño y ejemplos

Debido a los cambiantes estilos de vida y necesidades de la población, la industria alimentaria dedica esfuerzos en la producción de alimentos con múltiples beneficios fisiológicos que conllevan a un mejoramiento constante de la salud en general (146,147). En

este contexto, a lo largo del tiempo han aparecido gran variedad de vocablos que hacen alusión a los efectos beneficiosos potenciales de los alimentos como coadyuvantes y uno de los más actuales es el de “alimento de diseño”.

Los alimentos de diseño son definidos como “alimentos tradicionales modificados que aportan beneficios para la salud en comparación con los productos no modificados, el cual puede ser consumido como parte de una dieta diaria y presentado en apariencia similar al alimento base” (148).

Actualmente, existen pocos ejemplos consolidados como alimentos de diseño, pero uno de los más estudiados, es el huevo en el cual se han realizado modificaciones en sus nutrientes con la finalidad de mejorar la salud de los consumidores (149). Esto se logra mediante cambios en la alimentación de las gallinas para dar lugar a huevos con menor contenido de colesterol y una mayor proporción de ácidos grasos insaturados (150).

En los cárnicos, la industria ha implementado estrategias para diseñar productos basados en la utilización de materias primas más magras, reducir el aporte de lípidos y sustitutos de grasa (151). A su vez, los avances genéticos han brindado nuevas posibilidades en la mejora de las características de las carnes, a través de la modificación de aquellos genes que están relacionados con la modulación del contenido de lípidos y de su perfil de ácidos grasos (152). Algunas proteínas de origen vegetal, han sido incorporados en sistemas cárnicos con la finalidad de equilibrar el contenido de lisina y arginina y por ende tener efectos beneficios en la salud humana (153), por ejemplo, la soya, la cual además de proveer un perfil de aminoácidos diverso, le confiere un menor contenido de colesterol (154).

En definitiva, la elaboración y formulación de nuevos productos es uno de alcances más prometedores de la industria alimentaria, todo ello en gran parte puede estar relacionado a la presencia de ciertos compuestos bioactivos que han permitido no sólo conocer las propiedades de los alimentos sino, además, describir el proceso por el que origina dicho beneficio en la salud humana. Por tanto, el aprovechamiento de las bondades de los productos apíricos nos lleva a plantear el siguiente cuestionamiento: ¿un alimento de diseño formulado a base de miel, polen, jalea real y propóleo es una alternativa coadyuvante en la urolitiasis cálcica?

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La nefrolitiasis o también llamada litiasis renal, es una de las afecciones más frecuentes que tiene que enfrentar el urólogo y el médico general, en especial en el servicio de urgencia, si bien la medicina actual permite diagnosticarla en exámenes de rutina de laboratorio y de imagenología, la persona que la padece puede estar expuesto durante su vida al dolor y a complicaciones derivadas de la litiasis, además de su estrecha relación con la hipertensión, diabetes, obesidad, insuficiencia renal terminal y dislipidemias, así como una mayor predisposición en aquellos individuos que llevan una alimentación desequilibrada, rica en grasas saturadas, proteínas animales y sodio.

Los datos epidemiológicos son escasos, no obstante, se estima una prevalencia del 20% en América. Por otro lado, el empleo de los productos de las abejas, poseen atribuciones ancestrales a la salud, las cuales han sido evidenciadas científicamente como coadyuvante en diversas afecciones (actividad antiinflamatoria, vasoprotectoras, antioxidantes, anticancerígenas entre otras), no obstante, su consumo en México, ha disminuido a través del tiempo, por lo que el revalorizarlo, junto con su práctica, constituye una opción interesante para la elaboración de nuevos alimentos, aunado a la necesidad de incrementar los conocimientos sobre la eficacia de modelos animales de cálculos renales y a que no existen reportes que aborden el efecto benéfico en la salud de una mezcla (alimento de diseño), a partir de productos apiarios el presente proyecto tiene como finalidad demostrar el efecto del producto frente a un modelo *in vivo* de urolitiasis.

### **4. HIPÓTESIS**

El alimento de diseño formulado a base de miel, polen, jalea real y propóleo tiene efecto antilitiásico en ratas Wistar.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Proponer un alimento de diseño formulado con productos apíarios, a partir de su caracterización fisicoquímica, sensorial y funcional (*in vitro e in vivo*), para establecer su potencial uso en la prevención y como coadyuvante en el tratamiento de la litiasis renal.

### 5.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar la composición química de la miel, polen, jalea real y propóleo, a través de la cuantificación de flavonoides, ácidos fenólicos, ácidos grasos, ácido ascórbico y minerales, de importancia en la salud humana.
- 2) Analizar la estabilidad del alimento de diseño considerando parámetros de calidad (pH, acidez, contenido de HMF y color), cada 15 días durante 6 meses de almacenamiento (4°C, 24°C y 37°C); aceptabilidad sensorial mensual del producto a 24°C (descriptivos); y parámetros cinéticos
- 3) Evaluar los cambios en la concentración de antioxidantes (fenoles, ácido ascórbico), capacidad antioxidante (DPPH<sup>+</sup>, ABTS<sup>+</sup>, FRAP), así como la actividad quelante del alimento de diseño a 24°C, durante el almacenamiento de 6 meses.
- 4) Determinar la bioaccesibilidad intestinal *in vitro* de los compuestos antioxidantes (fenoles, ácido ascórbico) y capacidad antioxidante y quelante, al inicio y al final del almacenamiento de la muestra a 24°C.
- 5) Establecer la toxicidad subaguda, mediante la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) en un modelo *in vivo*.
- 6) Evaluar el efecto antilitiásico de la ingesta del alimento de diseño en un modelo *in vivo* de inducción de litiasis, a partir de la determinación de parámetros bioquímicos (urea, creatinina, ácido úrico, glucosa y proteínas totales) y en orina (urea, creatinina, ácido úrico) y análisis histológico en órganos de ratas Wistar, durante 4 semanas.

## 6. DISEÑO METODOLÓGICO

En las Figuras 5 y 6, se presentan el esquema del diseño experimental y sus diferentes fases, de acuerdo con los objetivos previamente planteados.

### 6.1. Diagrama del diseño experimental

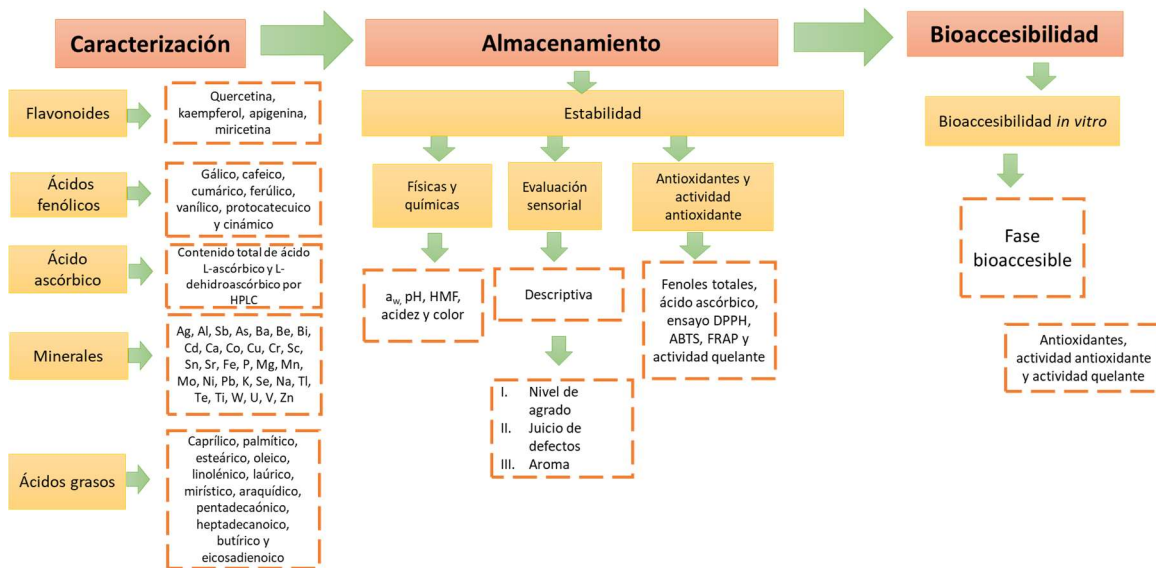


Figura 5. Diseño experimental parte I.

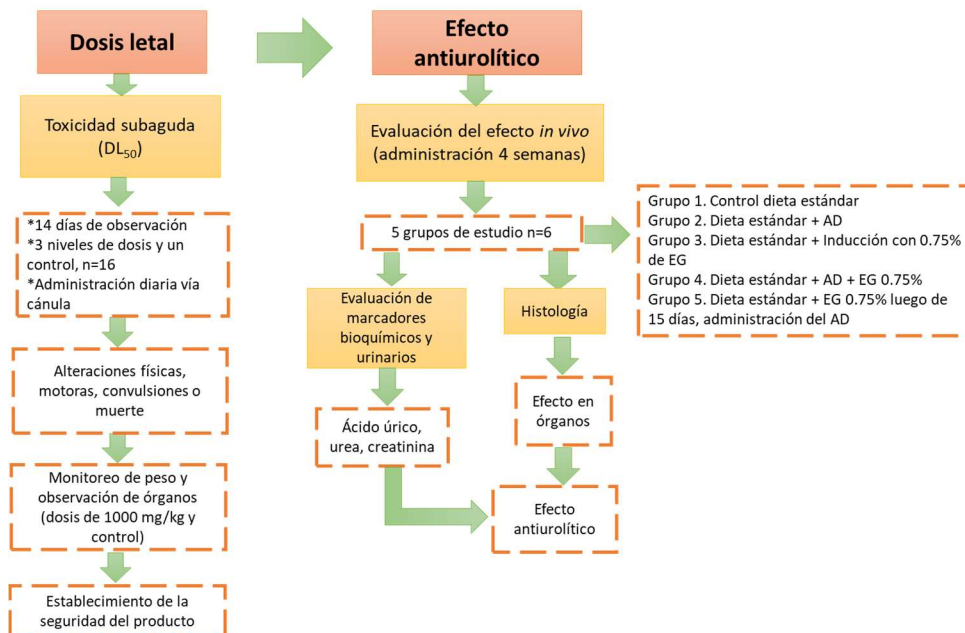


Figura 6. Diseño experimental parte II

## 6.2. Obtención de las muestras y preparación del producto

Las muestras de miel, polen, jalea real y propóleo fueron proporcionadas por el apicultor Hugo Narciso León, productor apiario de la marca “ANIHU”, provenientes del municipio de Tulancingo, Hidalgo, zona centro.

El propóleo se almacenó en congelación hasta su utilización. Durante su traslado, la jalea real se mantuvo en hielo para evitar alteraciones en sus componentes, posteriormente se congeló a -30°C. Finalmente, la miel y el polen se conservaron a temperatura ambiente hasta su utilización.

Una vez obtenidas las materias primas se procedió a la elaboración del producto denominado “alimento de diseño”, el cual contenía las proporciones que se muestran a continuación en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Formulación del alimento de diseño

Ingrediente/materia prima	%
Miel	66
Polen	25
Jalea real	2
Propóleo	0.1
Alcohol de caña	2.55
Otros componentes (agua, caramelo artificial, extracto de roble)	4.35

## 7. METODOLOGÍAS

### 7.1. Flavonoides y ácidos fenólicos por HPLC

Para realizar estas determinaciones se recurrió a tres métodos de preparación de muestras, los cuales se describen a continuación:

-Hidrólisis ácida (HAE). Para determinar los ácidos fenólicos presentes en polen y propóleo, se mezclaron 100 mg de la muestra, con 1 mL de una solución etanólica acuosa al 50% (v/v) y se centrifugaron a 12000 rpm, durante 10 min (Allegra 25, Beckman

Coulter, EUA), recogiendo los sobrenadantes (3 veces) y evaporando el solvente. Posterior a ello se sometió a hidrólisis con 2 mL de HCl 2N, después se realizó la extracción con acetato de etilo (3 mL, 3 veces), se evaporó el solvente y el extracto resultante se diluyó en etanol al 50%. Para el análisis de la miel y jalea real, únicamente se partió de 1 g de muestra y se procedió a la extracción con acetato de etilo (3 mL, 3 veces) y se reconstituyó con etanol al 50%, para obtener un volumen de 1 mL (155).

Para los flavonoides, las muestras de polen y propóleo, 100 mg se sometieron a hidrólisis ácida con HCl, después los compuestos se extrajeron con acetato de etilo (3 mL, 3 veces), el disolvente se evaporó a 45°C y el residuo se diluyó en etanol absoluto, mismo procedimiento se llevó a cabo en miel y jalea real, pero el peso inicial de la muestra fue de 1 g (156).

-Hidrólisis alcalina (HAAM). Consistió en pesar 100 mg de cada muestra (miel, jalea real, polen y propóleo), con 2 mL de NaOH 2M, posteriormente se ajustó el pH a 2 con HCl 3M, se procedió a añadir 4 mL de éter dietílico; recogiendo la fase orgánica, el disolvente se evaporó a 40°C. Finalmente, el extracto se disolvió con una mezcla de metanol: agua (50:50, v/v) (157).

-Extracción etanólica (EES). Se pesaron 100 mg de la muestra (propóleo, polen de abeja) o 1 g de jalea real y miel, por separado. Cada uno se mezcló con 10 mL de etanol: agua (80:20, v/v), seguido de ello, las muestras se sonicaron durante 20 min a 40 kHz y a 25°C, después las mezclas se llevaron a centrifugación (Allegra 25, Beckman Coulter, EE. UU.) durante 10 minutos (10,000 rpm). Finalmente, se recuperó el sobrenadante, se filtró a través de acrodiscos de 20 µm (158). Los extractos resultantes, por los diferentes métodos se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Los flavonoides y ácidos fenólicos se cuantificaron por HPLC, empleando el método reportado por Díaz-Batalla et al. (156), usando un detector con arreglo de diodos (Waters 2996, EUA) con automuestreador (Waters 717, EUA) y una columna Symmetry C18 (250mmx4.6mm, 5µm, WAT054275, Waters, Irlanda). La fase móvil (A) correspondió al acetonitrilo (JT Baker, EUA) y la fase móvil (B) consistió en agua acidificada al 1% con

ácido acético (Sigma-Aldrich, EUA) a pH 2.8, con un volumen de inyección de 20  $\mu$ L y un flujo de 1 mL/min. El gradiente utilizado para cada procedimiento se detalla en las Tablas 6 y 7.

**Tabla 6.** Condiciones de separación de flavonoides por HPLC

Tiempo	%Fase móvil A	%Fase móvil B
0	0	100
10	65	35
15	80	20
16	95	5
17	96	4
18	20	80
19	0	100
20	0	100

Se construyeron curvas de calibración de los estándares, midiendo cada uno de los compuestos a diferentes longitudes de onda, como: miricetina (252 nm), quercetina (254 nm), apigenina (266 nm) y kaempferol (265 nm). Para el caso particular de los ácidos fenólicos: ácido gálico (269 nm), cafeico (323 nm), vanílico (260 nm), cumárico (309 nm), ferúlico (322 nm), protocatecuico (259 nm) y cinámico (274 nm). Los resultados se expresaron en mg/100 g de muestra analizada.

**Tabla 7.** Condiciones de separación para ácidos fenólicos por HPLC

Tiempo	%Fase móvil A	%Fase móvil B
0	0	100
15	50	50
16	50	50
18	65	35
20	95	5
21	96	4
22	20	80
23	0	100
24	0	100



## 7.2. Contenido de ácido L-ascórbico y L-dehidroascórbico

Para la determinación del contenido L-ácido ascórbico en miel y jalea real, se pesaron 500 mg y se extrajo con 5 mL de ácido metafosfórico al 5%, se sonicó (baño ultrasónico Barnstead Lab Line 9302, EUA), durante 30 s y posteriormente se agitó vigorosamente con un vórtex (Scientific Industries, Inc, Vortex-Genie 2, EUA), transcurrido este proceso se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C, durante 10 min (Allegra 25, Beckman Coulter, EUA), el proceso se realizó 3 veces, colectando los sobrenadantes (159).

Para el propóleo y polen se tomaron 200 mg de la muestra adicionando 8 mL de ácido metafosfórico al 5% (p/v), se sonicó (baño ultrasónico Barnstead Lab Line 9302, EUA) durante 1 min, seguido de ello, se centrifugó a 10,000 rpm/10 min (Allegra 25, Beckman Coulter, EUA), colectando los sobrenadantes en un matraz de 10 mL, se filtró a través de acrodiscos de 0.22  $\mu\text{m}$  y finalmente se aforó al volumen previamente descrito (160).

Para la conversión de ácido L-ascórbico a L-dehidroascórbico se añadió al extracto resultante 2.5 mL de cisteína al 4% (p/v) a pH 7, ajustado con una solución de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  al 20% (p/v), se reposó 5 minutos, transcurrido el tiempo se ajustó nuevamente a pH 3 con ácido fosfórico al 20% (p/v). Finalmente se completó a un volumen final de 10 mL y se filtró en una membrana PVDF (161). Ambos se analizaron de inmediato y los resultados se expresaron en mg/100 g de muestra.

Por último, la identificación y cuantificación se realizó a través de un HPLC equipado con un detector con arreglo de diodos (Waters 2996, EUA) con automuestreador (Waters 717, EUA) y una columna Symmetry C18 (250x4.6mm, 5 $\mu\text{m}$ , WAT054275, Waters, Irlanda). La fase móvil fue de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1.8 mM (pH = 2.6), con un flujo de 0.9 mL/min y un volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$  (161).

## 7.3. Ácidos grasos

Este procedimiento se realizó de acuerdo con el método reportado por Añorve-Morga et al. (162) y Jarukas et al. (163), con algunas modificaciones. Se pesaron 0.5 g de muestra con 10 mL de una mezcla de cloroformo: metanol (1:1, J.T. Baker<sup>®</sup>, España), dejando reposar durante 48 horas. De cada muestra se tomó una alícuota de 500  $\mu\text{L}$  de la fase lipídica

resultante y se procedió a la metilación para la obtención de los ésteres metílicos. Para ello, a cada alícuota se le adicionó 1 mL de BF<sub>3</sub>: MeOH (12.5:100; v/v, Merck®). Posteriormente se sometieron a calentamiento en un baño a 90°C durante 10 minutos. Seguido de ello, se realizaron 2 lavados que consistieron en la adición de 1 mL de hexano (J.T. Baker®, España) y 1 mL de agua saturada de hexano, después, los tubos se agitaron con la ayuda de un vórtex (Scientific Industries, Inc, Vortex-Genie 2, EUA), durante 2 minutos, seguido de una centrifugación (Centurion Scientific Centrifuges® KD41; Reino Unido), a 4000 rpm, durante 10 min a 4°C. De esta manera se obtuvieron dos fases: una acuosa (inferior) que contenía las impurezas y la lipídica (superior) que contenía los metil ésteres de ácidos grasos, después se lavaron con 2 mL de agua saturada de hexano para eliminar de manera los compuestos hidrofílicos, nuevamente se desechó la fase acuosa y la fase lipídica resultante se mantuvo en congelación aproximadamente 5 horas.

El contenido resultante se transfirió a un vial de inyección de 2 mL con fondo V y se concentró con flujo de nitrógeno (N<sub>2</sub>) con el fin desplazar el oxígeno (O<sub>2</sub>) presente. Finalmente, se aforó cada vial a con diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; TEDIA®, EUA), para redissolver los metil ésteres de ácidos grasos y se inyectó un volumen de 1 mL

La identificación y cuantificación se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases (AutoSystem XL, Perkin Elmer, Australia), equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar (75 m x 0.18 mm, 0.14 µm; TM-2560, Supelco® SP, EUA) usando el modo de inyección *splitless* (1 µL). La temperatura inicial del inyector se fijó a 230°C y la del detector a 250°C, con un gradiente de temperatura inicial a 150°C, con incremento de 4°C/min, a 214°C, manteniéndola durante 2 min, luego se incrementó 2.5 °C/min a 244°C y se mantuvo 5 min, empleando nitrógeno como gas acarreador a un flujo constante de 1 mL/min. Finalmente, la identificación se realizó comparando los tiempos de retención de una mezcla patrón (FAME Mix C4-C24, Supelco®) con la ayuda de curvas de calibrado a diferentes concentraciones y se expresaron en %.

#### **7.4. Composición mineral**

Se determinó el contenido de 32 minerales, mediante Emisión Atómica con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES), utilizando un espectrómetro (Icap 6500 DUO,

Thermo Fisher Scientific, EUA). La mineralización para polen, propóleo y jalea real consistió en pesar 0.75 g de cada muestra, después se adicionaron 10 mL de ácido nítrico al 65%, seguido de calentamiento controlado a 180°C en un sistema de digestión (Gerhardt Tipo TR modelo KB8, Alemania) (164). La preparación de las muestras de miel se basó en la metodología referida por Lanjwani & Channa (165), el cual consistió en pesar 5g de la muestra seguido de la adición de 10 mL de ácido nítrico y 3 mL de peróxido de hidrógeno, luego se sometió a calentamiento a 180°C en el sistema de digestión. Posterior a ello, todas las muestras se enfriaron y se aforaron a 50 mL, una vez analizadas las muestras los resultados se expresaron en mg/100 g.

## **7.5. Propiedades fisicoquímicas**

Posterior a la elaboración de un total de 3 lotes del alimento de diseño, se dividieron en alícuotas para cada determinación en recipientes de vidrio cerrados herméticamente y protegidos de la luz, fijando su almacenaje a 3 diferentes temperaturas: 4, 24 y 37°C, con un monitoreo constante de la temperatura durante seis meses.

### **7.5.1. Actividad de agua ( $a_w$ )**

La actividad del agua se midió con un equipo de ACQUA LAB (Decagon Devices, EE. UU.). Se tomaron tres réplicas de la muestra, evaluándose en cada tiempo del muestreo (quincenal) y al comienzo del almacenamiento (166).

### **7.5.2. pH**

Se analizó utilizando un potenciómetro (Hanna Instruments, 210, EUA), después de su calibración con soluciones buffer de pH 4.0 y 7.0 estandarizados, mezclando 1 g de la muestra con 10 mL de agua desionizada (167).

### **7.5.3. Acidez**

Se realizó de acuerdo con el método de la AOAC 942.15 (1999), con una solución 0.1 N de NaOH, registrando la cantidad de mL de NaOH utilizada para neutralizar el ácido orgánico más representativo en cada una de las muestras, obteniendo los miligramos del ácido orgánico presente en la muestra (168). Los resultados se expresaron como mEq de ácido/kg.

#### 7.5.4. Hidroximetilfurfural (HMF)

Se cuantificó mediante el método establecido por la NMX-F 036-1997, que consiste en preparar una solución de ferrocianuro de potasio (solución de Carrez I) y otra de acetato de zinc (solución de Carrez II), a cada una se le añade 0.5 mL de la muestra de miel diluida, posteriormente se mide absorbancia a 284 nm y 336 nm a través de un lector de microplacas (Power Wave XS 11 UV-Biotek, software KC Junior, EUA). El contenido se expresó como mg/kg (169).

#### 7.5.5. Determinación de color

Para la medición de color se utilizó un colorímetro portátil (CM-608d, Minolta, Japón), aplicando el iluminante D65 con un ángulo de observación de 2°, obteniendo así los valores, según la escala CIELab, de  $L$ ,  $a$ ,  $b$ ,  $h$  y Croma, donde “ $L$ ” corresponde a la luminosidad con puntajes de 0 (negro) a 100 (blanco) y las coordenadas “ $a$ ” (+rojo a -verde) y “ $b$ ” (-azul a +amarillo), “hue” hace referencia a la tonalidad o tono, la cual se obtuvo a partir de la Ecuación 1 y se mide de 0° a 360°, representando el tono rojo (0°), amarillo (90°), verde (180°) y azul (270°). Croma se refiere a la saturación o intensidad de color (170), misma que se calculó mediante la Ecuación 2.

$$h_{ab} = \arctan\left(\frac{b}{a}\right) \quad [1]$$

$$C = \sqrt{(a^2+b^2)} \quad [2]$$

### 7.6. Parámetros cinéticos

#### 7.6.1. Orden de reacción y constante de velocidad de deterioro

Se determinaron mediante la linealización de las ecuaciones de la velocidad de reacción del modelo cinético, a través de un análisis de regresión lineal simple de la concentración de pH, acidez, parámetros de color e HMF *versus* el tiempo de almacenamiento (1, 30, 60, 90, 120 y 180 días), obteniendo una línea de tendencia de la ecuación  $y = mx + b$  y el coeficiente de determinación  $R^2$  (171), posteriormente, se identificó que el HMF presentó mayor ajuste.

Finalmente, se seleccionó el orden de reacción con mayor  $R^2$ , considerando las representaciones gráficas (Tabla 8).

**Tabla 8.** Ecuaciones para determinar el orden de reacción

Orden	Ecuación diferencial	Ecuación integrada	Representación gráfica	Pendiente
0	$v=k$	$[A]_t = -kt + [A]_0$	$[A]_t$ vs $t$	-k
1	$v=k[A]$	$\ln[A]_t = -kt + \ln[A]_0$	$\ln[A]_t$ vs $t$	-k
2	$v=k[A]^2$	$1/[A]_t = kt + 1/[A]_0$	$1/[A]_t$ vs $t$	k

Donde  $[A]_0$  es la concentración inicial del reactivo o compuesto,  $t$  es el tiempo (días de almacenamiento) y por último se determinó el valor  $k$ , que es la constante de proporcionalidad denominada “constante de velocidad” (171,172).

### 7.6.2. Tiempo de vida media

Con base en los valores  $k$  obtenidos de cada temperatura, se estimó el tiempo de vida media del producto según el orden de reacción con mayor ajuste (173), considerando las siguientes ecuaciones de la Tabla 9.

**Tabla 9.** Fórmulas para determinar tiempo de vida media

Orden de reacción	$t_{1/2}$
0	$[A]_0/2k$
1	$0.693/k$
2	$1/k[A]_0$

### 7.6.3. Determinación de la energía de activación

Se determinó con base al modelo de Arrhenius, el cual relaciona la velocidad de una reacción química a los cambios de temperatura (Ecuación 3).

$$\ln k = \ln k_0 \left( -\frac{E_a}{RT} \right) \quad [3]$$

Dónde:  $E_a$ : energía de activación ( $\text{kJ/mol}^{-1}$ );  $R$ : constante universal de los gases ( $8.314472 \text{ J mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ );  $T$ : temperatura absoluta (K).

Posteriormente se graficó el  $\ln$  (logaritmo natural) vs  $1/T$  para obtener una ecuación lineal y la pendiente, por último, la energía de activación ( $E_a$ ) se obtuvo mediante despeje de la Ecuación 3 (172).

### 7.7. Evaluación sensorial

La prueba sensorial, se llevó a cabo mediante la aplicación de un cuestionario de nivel de agrado del producto a 26 panelistas de 23 a 57 años ( $40.88 \pm 12.03$  años), incluyendo a profesores investigadores y alumnos de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y población externa, a través de una escala descriptiva para diferentes atributos permitiendo así ordenar las muestras, de acuerdo con su magnitud en los diferentes tiempos del almacenamiento (174–179). Se les proporcionó a los participantes un recipiente que contenía la muestra y se realizó el llenado del cuestionario, con intervalos de 1 mes entre cada una, hasta un total de 6, la valoración tuvo lugar entre las 10 y las 13 h. El cuestionario estuvo conformado por varios apartados (Anexo 1-5) que se describen a continuación:

- 1) Agrado del producto. A partir de una escala hedónica, donde 0 es el puntaje mínimo de agrado y 9 es el mayor valor que se le podía asignar, posterior a ello la suma de los puntos correspondía al juicio general de aceptación del producto, el cual puede ir desde “excelente” a “no aceptable” (175).
- 2) Juicio de defectos. El panelista describió la percepción de defectos visuales, olfativos, gustativos y táctiles otorgando puntuación desde el 1-9, donde los puntajes más bajos indican la presencia de defectos graves y los más altos corresponden a la ausencia de los mismos (180).
- 3) Aroma de la miel. Con ayuda de una ficha impresa de “paleta de aromas de la miel”, el evaluador indicaba los aromas percibidos predominantes y sus descriptores (179).

## **7.8. Contenido de antioxidantes**

### **7.8.1. Compuestos fenólicos totales**

Se efectuó según el método reportado por Stintzing et al. (181), utilizando el reactivo Folin Ciocalteu. Se preparó una solución con 1 mL de Folin (Sigma-Aldrich®, EUA), aforando a 10 mL con agua desionizada; solución de carbonato de sodio (7.5 g en 100 mL de agua); solución de ácido gálico (15 mg en 50 mL de agua). Se construyó una curva estándar de ácido gálico con concentraciones de 0,100,200 y 300 mg/L, posteriormente se tomaron 100 µL de muestra de cada una de las muestras, con la adición de 500 µl de Folin y 400 µL de carbonato de sodio (al 7.5%) en viales, se agitó y se reposó 30 minutos. La absorbancia se midió en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, EUA) a 765 nm. Los resultados se expresaron como miligramos de equivalentes de ácido gálico en 100 gramos (mg EAG/100 g).

### **7.8.2. Ácido L-ascórbico**

Se realizó de acuerdo al método de Dürüst et al. (182), para lo cual se preparó una solución con 3 mg de 2,6-Diclorofenolindofenol (DCPI, Sigma-Aldrich®, Alemania), diluido en 250 mL de agua desionizada; solución de ácido oxálico (1g) diluido a 250 mL de agua desionizada; solución de ácido ascórbico con 100 mL de la solución de ácido oxálico y finalmente una solución amortiguadora (3 g de acetato de sodio aforado con 10 mL de ácido acético glacial y 7 mL de agua desionizada).

Se construyó una curva estándar de ácido ascórbico (Meyer®, México) usando concentraciones de 0-50 mg/L (ácido ascórbico/agua desionizada). La absorbancia se midió a 520 nm en un lector de microplacas (Power Wave XS 11 UV-Biotek, software KC Junior, EUA), los valores se expresaron como miligramos equivalentes de ácido ascórbico en 100 gramos (mg EAA/100 g).

## **7.9. Capacidad antioxidante**

### **7.9.1. DPPH<sup>•+</sup>**

Se evaluó según la metodología reportada por Morales y Jiménez-Pérez (183). De inicio, se preparó una solución con 7.4 mg de DPPH<sup>•+</sup> (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA), aforando a 100 mL con etanol, utilizando una curva estándar de Trolox en concentraciones de 0, 100, 200 y 300  $\mu\text{mol ET/L}$ , posteriormente se tomaron alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  de cada muestra y 500  $\mu\text{L}$  de la solución de DPPH<sup>•+</sup>, se agitó en vórtex y se dejó reposar una hora, después, la absorbancia se determinó en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, EUA) a 520 nm. Los resultados se expresaron como micromol equivalentes de trolox en 100 gramos ( $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ ).

### **7.9.2. ABTS<sup>•+</sup>**

Se efectuó de acuerdo con Kuskoski et al. (184), preparando una solución de ABTS<sup>•+</sup> a 7 mmol (76.8 mg de ABTS<sup>•+</sup> Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA), diluido en 20 mL de agua desionizada), se añadió persulfato de potasio al 2.45 mM, (6.6 mg en 10 mL de agua) y se dejó reposar por 16 horas, transcurrido el tiempo se diluyó en agua hasta obtener una lectura de absorbancia  $0.7\pm 0.1$  a 754 nm. Así mismo, se preparó una curva estándar con ácido ascórbico. Enseguida se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra y 980  $\mu\text{L}$  de la dilución de ABTS<sup>•+</sup>, con un tiempo de reposo de 7 min, tomando una lectura espectrofotométrica a 754 nm en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, EUA). Las cifras obtenidas se expresaron como miligramos equivalentes de ácido ascórbico en 100 gramos (mg EAA/100 g).

### **7.9.3. FRAP**

Se determinó acorde a la metodología de Pérez-Jiménez et al. (185). El cual inicia con la preparación del reactivo de FRAP en una concentración 10:1:1 con 100 mL de un amortiguador de acetato de sodio (0.3 M a pH 3.6, ajustado con ácido acético glacial), 10 mL de TPTZ (2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA) y 10 mL de  $\text{FeCl}_3$  (Merck<sup>®</sup>, Alemania), con una curva estándar de sulfato ferroso en concentraciones de 0, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{M Fe}^{+2}/\text{L}$ .



Para ejecutar la técnica, se tomaron 30  $\mu\text{L}$  de la muestra, 90  $\mu\text{L}$  y 900  $\mu\text{L}$  de FRAP, la mezcla resultante se pasó por un vórtex y se dejó en un baño de agua durante 10 minutos, finalmente, se tomó lectura espectrofotométrica a 593 nm, expresándose como micromoles equivalentes de  $\text{Fe}^{+2}$  por 100 gramos ( $\mu\text{mol Fe}^{+2}/100 \text{ g}$ ).

#### **7.10. Actividad quelante**

Se determinó siguiendo el método propuesto por Gülcin et al. (186), partiendo de una solución de EDTA (Meyer<sup>®</sup>, México) a 0.1M y muestras control agua desionizada, colocando 100  $\mu\text{L}$  de muestra, 50  $\mu\text{L}$  una solución de cloruro férrico (Merck<sup>®</sup>, Alemania) y 450  $\mu\text{L}$  de ferrozina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA). Posteriormente, la mezcla se homogeneizó y se mantuvo en reposo durante 10 min para completar la reacción durante 10 minutos. La absorbancia se midió a 520 nm. Los resultados se expresaron en porcentaje (Ecuación 4).

$$\% \text{ Actividad quelante} = \left( \frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) * 100 \quad [4]$$

Dónde:  $A_0$ , absorbancia de la muestra control;  $A_1$ , absorbancia de la muestra

#### **7.11. Bioaccesibilidad intestinal *in vitro***

Se evaluó mediante un modelo de digestión *in vitro* (187,188). Para ello, se colocaron 500 mg de muestra en tubos de centrifuga de 50 mL, se agregaron 20 mL de agua desionizada y se usó HCl 6 M (Karal<sup>®</sup>, México), para ajustar el pH a 2, a continuación, se adicionaron 120  $\mu\text{L}$  de pepsina (40 mg pepsina; Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA, en 1 mL de HCl 0.1 M), para ser incubada en agitación (37°C, 60 rpm por 2 h) usando un baño de agitación (LSI-3016, LabTech, EUA). Seguido de ello, se agregaron 1.5 mL de una disolución de pancreatina, colato de sodio y desoxicolato de sodio, en donde se pesaron 5 mg de pancreatina (P-1750 Sigma-Aldrich, EUA), 12.5 mg de colato de sodio hidratado (C6445, Sigma-Aldrich, EUA) y 12.5 mg de desoxicolato de sodio (D6750, Sigma-Aldrich, EUA) por cada mL de bicarbonato de sodio 0.1 M (J. T. Baker<sup>®</sup>, España).

Las muestras digeridas por las enzimas se colocaron en una membrana de diálisis (tamaño de corte 12 kDa, Sigma-Aldrich, EUA) para ser dializadas en una solución de

bicarbonato de sodio (0.1 M), a pH 7.5, incubadas a 37°C, 60 rpm por 16 horas. Transcurrido el tiempo, la fracción dializada, es decir, aquella que traspasó la membrana de diálisis se utilizó para determinar la cantidad de compuestos bioaccesibles (compuestos fenólicos totales, capacidad antioxidante) siguiendo las metodologías descritas con anterioridad.

La bioaccesibilidad se calculó como la diferencia de los parámetros obtenidos antes (muestra original) y después del tratamiento de digestión *in vitro*, los datos se emplearon como indicador de la bioaccesibilidad en intestino delgado. Por otro lado, el contenido dentro de la membrana de diálisis (fracción no dializada y no digerible) se colocó en un tubo de centrífuga (50 mL) y el precipitado obtenido considerado como la fracción indigestible solo se almacenó (189). La bioaccesibilidad en intestino delgado (BI), se calculó mediante la Ecuación 5.

$$BI (\%) = \frac{\text{mg dializados en intestino delgado}}{\text{mg fenoles en la muestra inicial}} * 100 \quad [5]$$

#### **7.12. Dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>)**

Para la evaluación de la seguridad del producto, se llevó a cabo la determinación de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) de acuerdo con los criterios referido por la OECD (190), tomando en cuenta los siguientes elementos:

*Preparación de las dosis.* El agente de prueba se administró diariamente usando una concentración uniforme a una dosis determinada por vía oral (2 mL) prefiriendo los roedores de 5 a 7 semanas de edad con un peso promedio (190,191), ello se determinó previamente mediante pruebas de dilución del agente.

*Número y sexo de los animales.* Se usaron 4 animales en cada nivel de dosis (250, 500 y 1000 mg/kg/día), con un grupo control para establecer la repetitividad, la persistencia o la aparición tardía de efectos tóxicos, durante 14 días (190).

*Dosis.* Se tuvieron 3 grupos de prueba (250, 500, 1000 mg) y un grupo de control.

Posterior a ello, se realizó el sacrificio de los animales mediante una cámara de CO<sub>2</sub> y se procedió a observar los efectos visibles en órganos contrastando el grupo control y la dosis más alta (1000 mg/kg), a través de un microscopio estereoscópico.

*Evaluación.* Los datos obtenidos se utilizaron para establecer el grado o nivel de toxicidad del producto.

## **7.13. Evaluación del efecto antilitiásico**

### **7.13.1. Diseño experimental**

El efecto antilitiásico se estudió empleando la metodología reportada por Aksoy et al. (124), con algunas modificaciones ya que se utilizó una solución acuosa de etilenglicol (J. T. Baker<sup>®</sup>, España), al 0.75% en vez del 1%, teniendo una duración de 4 semanas. Para la conformación de los grupos se hizo aleatoriamente, con un total de 30 ratas Wistar, (n=6), de un peso aproximado de 200-250 g, organizados de la siguiente forma:

- Grupo control. Control dieta estándar *ad libitum*
- Grupo EG. Dieta estándar *ad libitum* + Inducción de litiasis con solución de 0.75% de etilenglicol.
- Grupo AD. Dieta estándar *ad libitum* + alimento de diseño (1000 mg/kg/día).
- Grupo AD+EG. Dieta estándar *ad libitum* + alimento de diseño (1000 mg/kg/día) + inducción de litiasis con solución de 0.75% de etilenglicol (oral).
- Grupo EG+AD. Dieta estándar *ad libitum* + Inducción de litiasis, con solución de 0.75% de etilenglicol (oral), luego de 14 días comenzó la administración del alimento de diseño (1000 mg/kg/día).

\*El protocolo se sometió para su aprobación por el Comité Institucional Ético para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio, siguiendo las especificaciones técnicas, con número de folio CICUAL/004/2021.

### **7.13.2. Examen químico de la orina**

Se llevó a cabo la recolección de orina mediante jaulas metabólicas, posteriormente se utilizaron tiras reactivas para uroanálisis aptas para el instrumento de medición (Contec<sup>®</sup>, Singapur). Los parámetros que se midieron fueron: densidad urinaria, urobilinógeno, bilirrubina, sangre, cetonas, glucosa, proteína y leucocitos (192), a través del analizador portátil de orina (BC401 Contec<sup>®</sup>, Singapur). Los datos obtenidos se expresaron en mg/dL, células/ $\mu$ L.

### **7.13.3. Análisis del sedimento urinario**

Este procedimiento se realizó con la finalidad de observar la instauración del daño (presencia de cristales que sugerían litiasis) y para obtener imágenes de las diferencias entre los grupos. Transcurridos 14 días de la administración, se tomó una alícuota de 1 mL (orina de 24 h), se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min (Allegra 25, Beckman Coulter, EUA), después se tomaron 950  $\mu$ L del sobrenadante y se procedió a la observación de alrededor 10  $\mu$ L sobre el microscopio (LOMO-BIOLAM) (193). Por último, se tomaron evidencias fotográficas de cada sedimento para observar las diferencias estructurales encontradas.

### **7.13.4. Ensayos bioquímicos plasmáticos**

Se realizaron por medio de punción de la vena para los análisis pre-administración y por punción cardiaca para la fase post experimental, se recogieron en tubos capilares que contenían heparina, todo ello para la determinación de los niveles de glucosa, creatinina, urea, ácido úrico y proteínas totales en plasma, a través de kits comerciales.

*Glucosa.* Se realizó mediante el kit comercial “Glucosa LQ” (Spinreact S.A, España), basado en la oxidación de la glucosa en presencia de glucosa peroxidasa. Siguiendo las especificaciones del fabricante, se tomaron alícuotas de 10  $\mu$ L y se añadió 1 mL del reactivo principal (TRIS pH 7.4, fenol, glucosa oxidasa, peroxidasa y 4-Aminofenazona), con una lectura de absorbancia a 505 nm, posterior a una incubación 10 minutos a 37°C. Los resultados se expresaron como mg/dL, mediante un patrón primario acuoso de glucosa de 100 mg/dL. Con un rango de medida desde el límite de detección de 0.3709 mg/dL hasta el límite de linealidad de 500 mg/dL.

*Creatinina.* Se analizó usando el kit comercial “Creatinine –J” (Spinreact S.A, España), el cual se basa en una reacción de la creatinina con picrato alcalino, siguiendo las especificaciones del fabricante. Se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L, a la cual se le adicionó una mezcla de ácido pícrico e hidróxido de sodio. Luego se tomó lectura a 492 nm, a los 30 y 90 segundos. Los resultados se expresaron en mg/dL y para la orina fueron corregidos por el factor de dilución para expresarlos en mg/24h. Con un patrón primario acuoso de creatinina de 2 mg/dL y con límite de detección de 0.09 mg/dL hasta el límite de linealidad de 15 mg/dL.

*Ácido úrico.* Se determinó por el método de uricasa, con el kit comercial “Ácido Úrico-LQ” (Spinreact S.A, España), tomando una alícuota de 25  $\mu$ L de la muestra, con adición de una solución que contenía un tampón (fosfatos pH 7.4 y DCPS) y enzimas (uricasa, POD, ascorbato oxidasa y 4-AF), posteriormente, se sometió a baño a 37°C, durante 5 min y se leyó absorbancia a 520 nm. Lo obtenido se expresó en mg/dL en plasma y en mg/24h en muestras urinarias. Se determinó en contraste de un patrón primario acuoso de ácido úrico de 6 mg/dL. Desde el límite de detección de 0.01647 hasta el límite de linealidad de 40 mg/dL.

*Urea.* Se efectuó mediante el kit comercial “Urea-37” (Spinreact S.A, España). Se tomó una alícuota de 50  $\mu$ L de muestra y se mezcló con 1 mL de o-Ftalaldehído (4.8 mmol/L) y 1 mL de solución borato (87 mmol/L) y ácido sulfúrico (3 mol/L), se mezcló y enseguida se incubó 15 min a 37°C. Los datos obtenidos se expresaron en mg/dL en plasma y en g/24 h en orina. Se calcularon en contraste a un patrón primario acuoso de urea de 50 mg/dL. Desde el límite de detección de 0.7 al límite de linealidad de 200 mg/dL.

*Proteínas totales.* Se analizó con el kit “Proteínas totales. Biuret” (Spinreact S.A, España), partiendo de una alícuota de 25  $\mu$ L, a la que se le adicionó 1 mL del reactivo que contenía tartrato mixto de sodio y potasio (15 mmol/L), yoduro sodio (100 mmol/L), yoduro de potasio (5 mmol/L), sulfato de cobre (5 mmol/L) e hidróxido de sodio (1000 mmol/L), enseguida se incubó 5 min a 37°C y se leyó absorbancia a 540 nm. Las cifras obtenidas se reportaron en g/dL y se calcularon en contraste a un patrón primario acuoso de albúmina bovina de 7 g/dL con un límite de detección de 0.007 g/dL, al límite de linealidad de 14 g/dL.

#### **7.13.5. Recolección de orina de 24 horas**

Los animales se alojaron en jaulas metabólicas para la recolección de muestras de orina de 24 horas, posteriormente se tomaron alícuotas manteniéndolas a -20°C (194).

#### **7.13.6. Ensayos bioquímicos en orina**

Las muestras se centrifugaron después de recolección a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se llevó a cabo con el método propuesto por El-Menyiy et al. (123) para la cuantificación de creatinina, ácido úrico y urea. Las metodologías utilizadas para cada biomarcador se describieron en la sección 7.13.4.

#### **7.13.7. Método de analgesia y eutanasia**

Previo a la extracción de los órganos, los animales se anestesiaron siguiendo las recomendaciones y especificaciones de la Federación de Asociaciones Europeas para la Ciencia de los Animales de Laboratorio (FELASA) y la Asociación Americana de Médicos Veterinarios, de acuerdo con el siguiente protocolo: empleo de una dosis de 0.025 mg/kg de buprenorfina (PiSA-Farmacéutica, México) para analgesia preventiva y pentobarbital (Pet's Pharma, México), a dosis de 70 mg/kg (vía intraperitoneal), con fines de anestesia quirúrgica. Una vez obtenidos los órganos, el método de eutanasia fue mediante la administración de pentobarbital de sodio (Pet's Pharma, México) administrando una dosis de 150-270 mg/kg, vía intraperitoneal (195–197).

#### **7.13.8. Análisis histológico**

Este procedimiento se efectuó para conocer los efectos del producto sobre la deposición de cristales y la calcificación en los túbulos renales, después de un ayuno de 12 h, después se procedió a la nefrectomía bilateral, luego fueron lavados con NaCl 0.9% (PiSA-Farmacéutica, México) y conservados en una solución tamponada de formol (J. T. Baker<sup>®</sup>, España) al 10% y se conservaron finalmente a -20°C hasta su análisis (102,198,199).

El análisis histopatológico se realizó conforme la metodología de Narter et al. (14), con la observación al microscopio de secciones del órgano, por medio de la inclusión en

parafina y tinción con hematoxilina y eosina (H&E, Merck<sup>®</sup>, Alemania), así como mediante luz polarizada, ambos procesos en 10x y 40x.

Se analizaron un promedio de 10-20 campos de cada sección de tejido, para después construir una escala para categorizar el daño o la intensidad de cada indicador (degeneración renal, necrosis, inflamación, urolitiasis, fibrosis y dilatación tubular proximal), de la siguiente forma (200):

- a) Menos del 20% de los campos, correspondía la categoría de “no detectable” (-)
- b) Identificación en el 20-30% de los campos analizados, obtenía la denominación de “lesiones leves” (+).
- c) En más del 30% y hasta el 60%, correspondía la denominación de “lesiones moderadas” (++)
- d) Más del 60 al 90% de los campos, corresponde a la categoría de “lesiones focales severas” (+++)
- e) >90%-100%, denominación de “lesiones difusas severas” (++++).

#### **7.14. Análisis estadístico**

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, a través del programa SPSS<sup>®</sup>, expresándolos como la media y desviación estándar, también se elaboró un análisis de varianza a una vía (ANOVA), aplicando una prueba Tukey a las diferencias entre las medias, así como T de *Student* para con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . Los resultados de la cuantificación de ácidos grasos se analizaron y obtuvieron mediante el software Origin2022b<sup>®</sup>.

## **8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **8.1. Caracterización del alimento de diseño**

#### **8.1.1. Identificación y cuantificación de flavonoides y ácidos fenólicos**

Los ácidos fenólicos y flavonoides, se consideran compuestos que le confieren a los alimentos la capacidad antioxidante (201) y que a su vez están implicados en el mejoramiento de la salud humana (202).

Los resultados obtenidos de flavonoides se muestran en la Tabla 10. El contenido de miricetina se encontró en el rango de 8.22-22.16 mg/100 g, en quercetina fueron de 5.82-221.51 mg/100 g, para apigenina 2.1-24.60 mg/100 g y kaempferol 0.87-52.26 mg/100 g. Los resultados muestran la identificación de miricetina y apigenina en miel con la extracción de hidrólisis ácida-etanol (HAE), encontrando concentraciones más altas que los reportados por Perna et al., (203). Por otro lado, se ha evidenciado que el uso de acetato de etilo junto con hidrólisis ácida mejora la eficiencia de la extracción de compuestos antioxidantes (204), lo cual puede justificar la identificación de estos flavonoides en el presente estudio.

La extracción HAE en polen, también mostró mejor eficiencia en la identificación de flavonoides, al reportar miricetina, quercetina, apigenina y kaempferol, con valores de hasta  $61.18 \pm 0.36$  mg/100 g, no obstante, hubo menor diferencia ( $p < 0.05$ ) en el contenido de quercetina en la extracción HAE con 42.90 mg/100 g, en comparación con la extracción etanólica + sonicación (EES) (61.18 mg/100 g). Esto se debe a que la sonicación induce un colapso de las burbujas por cavitación, resultando en la destrucción de la pared celular y permitiendo así una mejor interacción del solvente, mejorando la eficiencia de extracción para algunos compuestos (205).

Entre los principales flavonoides reportados en jalea real incluyen flavonoles como la quercetina, galangina y kaempferol, así como flavonas, tales como apigenina, acetina, crisina y luteolina (206). De acuerdo con lo presentado en la Tabla 10, se observó la presencia de quercetina ( $5.82 \pm 0.20$  mg/100 g) mediante la extracción HAAM (hidrólisis alcalina y ácida metanol). Con respecto a la apigenina, se identificó en dos métodos: HAAM y EE, mientras que con el proceso EE su cuantificación fue menor (2.15 mg/100 g,  $p < 0.05$ ). Esto puede tener su origen a que este procedimiento implicó el empleo de NaOH 2M previo a hidrólisis con HCl. En este sentido, Jusoh et al. (207) han reportado que una molaridad superior a 1M, puede disminuir la eficiencia de extracción de los polifenoles, generando una reducción de 32 a 53%.

Finalmente, el propóleo representó las cifras más altas significativamente para 3 de los 4 flavonoides analizados. El rendimiento en la extracción e identificación de quercetina alcanzó una máxima eficiencia en EES comparado con las demás. Esta diferencia se debió al efecto mecánico que provoca la sonicación, generando una mayor superficie de contacto entre el solvente (etanol) y la muestra (208).



Cabe mencionar que la eficiencia de la extracción para la identificación de los flavonoides en los alimentos, está relacionada a diferentes factores como puede ser el tiempo de extracción, el tipo de solvente, así como la polaridad del compuesto bioactivo, y el empleo de soluciones de solventes orgánicos (generalmente al 50%), tiene un rendimiento de recuperación más alto en comparación al etanol absoluto, acetonitrilo y metanol absoluto (209).

**Tabla 10.** Perfil de flavonoides (mg/100 g) de miel, polen, jalea real y propóleo mediante extracción con hidrólisis ácida, éter y etanólica

Muestra	Extracción	Miricetina	Quercetina	Apigenina	Kaempferol
Miel	HAE	8.22±0.07 <sup>c</sup>	<LOD	3.26±0.09 <sup>e</sup>	<LOD
	HAAM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	EES	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Polen	HAE	21.06±0.67 <sup>b</sup>	42.90±3.97 <sup>c</sup>	19.43±1.73 <sup>c</sup>	52.26±4.39 <sup>a</sup>
	HAAM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	EES	<LOD	61.18±0.36 <sup>b</sup>	<LOD	<LOD
Jalea real	HAE	<LOD	<LOD	<LOD	0.87±0.02 <sup>c</sup>
	HAAM	<LOD	5.82±0.20 <sup>e</sup>	2.15±0.04 <sup>e</sup>	<LOD
	EES	<LOD	<LOD	4.73±0.08 <sup>d</sup>	5.58±0.01 <sup>b</sup>
Propóleo	HAE	22.16±0.55 <sup>a</sup>	40.79±0.12 <sup>c</sup>	24.60±2.42 <sup>a</sup>	<LOD
	HAAM	<LOD	24.58±2.17 <sup>d</sup>	21.44±0.02 <sup>b</sup>	<LOD
	EES	<LOD	221.51±0.90 <sup>a</sup>	<LOD	<LOD

<sup>a-d</sup> Letras superíndice indica diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0.05$ ). Promedio de tres réplicas y desviación estándar. <LOD (15.6 µg/g) = valores por debajo del índice de detección. HAE=Hidrólisis ácida-etanol; HAAM= Hidrólisis alcalina y ácida-metanol; EES= extracción etanólica + sonicación.

Los resultados del perfil de ácidos fenólicos en las muestras se presentan en la Tabla 11. Los intervalos de concentración que se encontraron fueron: ácido cafeico (1.12-37.83 mg/100 g), vanílico (2.21-5.29 mg/100 g), cumárico (0.39-31.45 mg), ferúlico (1.36-55.73 mg/100 g), cinámico (0.53-11.6 mg/100 g), protocatecuico (22.32-31.85 mg/100 g). El ácido gálico sólo se identificó en la muestra de miel, con un valor de 4.02±0.01 mg/100 g.

Se observa que en miel, para la extracción HAE (hidrólisis ácida-etanol), se identificó el ácido cafeico y ferúlico, mientras que en EES (extracción etanólica + sonicación) fue gálico y vanílico, siendo el gálico el más alto (4.02±0.01 mg/100 g). Biesaga y Pyszynska, (210) compararon la aplicación de baño con sonicación y extracción asistida por microondas, en muestras con diluidas con agua acidificada y metanol, encontrando que el baño con

sonicación puede lograr recuperaciones alrededor del 90% de los compuestos fenólicos en miel, aun en tiempos tan cortos como 5 min, pudiendo explicar los resultados en EES.

En cuanto al polen, el ácido ferúlico se encontró en los 3 tipos de extracción, las cifras más altas ( $p < 0.05$ ) correspondieron a la extracción EES con 55.73 mg/100 g. Se ha mencionado que la recuperación de los flavonoides en forma de agliconas (compuestos de bajo peso molecular) y los ácidos fenólicos, se lleva a cabo eficazmente con disolventes como éter dietílico y acetato de etilo (211), no obstante, se puede apreciar que aun con el uso de acetato de etilo o éter dietílico, la sonicación de la extracción EES, fue más eficaz para la recuperación del ácido ferúlico en comparación a los otros métodos.

En jalea real, solamente en HAE se identificó el ácido *p*-cumárico, cinámico, mientras que ácido protocatecuico en la HAAM (hidrólisis alcalina y ácida-metanol). Finalmente, en propóleo los datos indican la presencia de ácido cafeico, vanílico, ferúlico cumárico y cinámico, siendo el primero el predominante con 37.83 mg/100 g. Las diferencias encontradas se deben a que el método HAE incluyó una hidrólisis con temperaturas altas y la EES requería ultrasonido, deduciendo que para la recuperación del ácido cafeico la sonicación fue más eficiente que el resto de los procedimientos. Por otro lado, los resultados para el ácido cafeico son menores a los reportados en muestras de propóleo originario de España (6-60 mg/g) (212).

Aarabi et al. (213) estandarizaron un procedimiento de extracción y purificación del ácido ferúlico, indicando que las condiciones óptimas se obtienen mediante una extracción alcalina con NaOH 2M, 12 horas y 41°C, por tanto, en el presente estudio en la HAAM, al tener condiciones muy similares en su procedimiento, ocasionó mayor contenido comparado con HAE en propóleo, siendo hasta 6 veces mayor.

Se ha evidenciado que los fitoquímicos tienen efecto coadyuvante en algunas enfermedades, entre ellas, la urolitiasis. La quercetina actúa como inhibidor de la formación de cristales de oxalato (214). El kaempferol por su parte, ha demostrado un efecto atenuante de los depósitos de oxalato de calcio y de la lesión renal causada por la litiasis (215). Por otro lado, en estudios *in vitro*, se ha establecido que el ácido gálico puede inhibir hasta en 57% la

formación de cristales de oxalato de calcio (216). El ácido cafeico, por último, ha descrito efectos similares en un modelo de litiasis en ratas (217).

Además de los ácidos fenólicos y flavonoides, existen otros compuestos con capacidad antioxidante con interesantes mecanismos benéficos en la salud humana, entre ellos sobresale el ácido ascórbico.

**Tabla 11.** Perfil de ácidos fenólicos (mg/100 g) de miel, polen, jalea real y propóleo mediante extracción con hidrólisis ácida, éter y etanólica

Muestra	Extracción	Ácido gálico	Ácido cafeico	Ácido vanílico	Ácido cumárico	Ácido ferúlico	Ácido cinámico	Ácido protocatecuico
Miel	HAE	<LOD	1.13±0.04 <sup>c</sup>	<LOD	<LOD	1.36±0.00 <sup>f</sup>	<LOD	<LOD
	HAAM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	EES	4.02±0.01 <sup>a</sup>	<LOD	2.21±0.04 <sup>c</sup>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Polen	HAE	<LOD	<LOD	<LOD	7.02±0.78 <sup>c</sup>	17.17±1.30 <sup>c</sup>	11.06±07 <sup>a</sup>	<LOD
	HAAM	<LOD	<LOD	5.29±0.26 <sup>a</sup>	22.76±0.06 <sup>b</sup>	10.20±0.02 <sup>e</sup>	<LOD	22.32±0.19 <sup>b</sup>
	EES	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	55.73±2.09 <sup>a</sup>	<LOD	<LOD
Jalea real	HAE	<LOD	<LOD	<LOD	0.39±0.00 <sup>d</sup>	<LOD	0.53±0.00 <sup>c</sup>	<LOD
	HAAM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	31.85±0.09 <sup>a</sup>
	EES	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Propóleo	HAE	<LOD	4.94±0.04 <sup>b</sup>	3.91±0.84 <sup>b</sup>	<LOD	<LOD	10.82±0.19 <sup>b</sup>	<LOD
	HAAM	<LOD	<LOD	<LOD	31.45±0.60 <sup>a</sup>	21.72±0.11 <sup>b</sup>	<LOD	<LOD
	EES	<LOD	37.83±0.94 <sup>a</sup>	<LOD	<LOD	15.54±0.21 <sup>d</sup>	<LOD	<LOD

<sup>a-d</sup> Letras superíndice indica diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0.05$ ). Promedio de tres réplicas y desviación estándar. <LOD (8.9 µg/g) = valores por debajo del índice de detección. HAE=Hidrólisis ácida-etanol; HAAM= Hidrólisis alcalina y ácida-metanol; EES= extracción etanólica + sonicación.

### **8.1.2. Contenido de ácido L-ascórbico y ácido L-dehidroascórbico en miel, polen y jalea real**

El ácido ascórbico está presente en una gran variedad de alimentos de origen vegetal y en forma de suplementos, además está implicado en múltiples efectos para la salud humana, como la biosíntesis de colágeno, metabolismo de proteínas, síntesis de neurotransmisores (218), mejoramiento del sistema inmunológico, de la salud cardiovascular, entre otras (219). El requerimiento promedio de este micronutriente en adultos se establece en 70 mg/día para mujeres y 90 mg/día en hombres (220), su absorción es dependiente de la dosis, se estima en aproximadamente 70 a 90%, sin embargo, en dosis superiores a 1 g/día, este porcentaje decrece hasta un 50% (219).

El ácido ascórbico puede perderse durante el almacenamiento de los alimentos y convertirse a ácido L-dehidroascórbico (DHA), debido a condiciones cambiantes de pH, luz u oxígeno (221), ello a causa de la oxidación y la posterior degradación a ácido dicetoglucónico (222).

Anteriormente se pensaba que debido a la inestabilidad del ácido dehidroascórbico y a su vida media en el organismo, no tenía alguna función reguladora o metabólica, no obstante, en la actualidad se establece que este compuesto puede ser un regulador de la viabilidad de las células tumorales (223). Por tanto, la cuantificación e identificación del ácido ascórbico y dehidroascórbico resulta de vital importancia para la caracterización de los alimentos.

En la Tabla 12 se muestra el contenido de ácido L-ascórbico (AA) y L-dehidroascórbico (DHA) en miel, polen y jalea real. Los valores más altos ( $p < 0.05$ ) para ambos componentes se observaron en el polen, con 52.54 mg/100 g y 10.11 mg/100 g, respectivamente.

**Tabla 12.** Contenido de ácido L-ascórbico y ácido L-dehidroascórbico (mg/100 g) de productos apiarios

Muestra	Ácido L- ascórbico	Ácido L-dehidroascórbico
Miel	1.53±0.05 <sup>c</sup>	1.59±0.14 <sup>b</sup>
Polen	52.54±0.14 <sup>a</sup>	10.11±0.94 <sup>a</sup>
Jalea real	11.03±1.04 <sup>b</sup>	2.90±0.25 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup> Indica diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0.05$ )

Los resultados del presente estudio en polen son más altos en comparación a lo descrito en polen originario de China (31.3 mg/100 g de AA y 2 mg/100 g de DHA) (160).

El efecto del ácido ascórbico en la nefrolitiasis es controversial, se establece que el ácido ascórbico en exceso (con un aporte mayor a 1 g/día), pudiera aumentar la predisposición a la formación de cálculos cuando se administra en cantidades mayores de 500 mg/día (224,225), este riesgo pudiera ser de hasta un 41% mayor, en comparación a un aporte promedio de 90 mg/día (8). No obstante, el alimento de diseño aporta aproximadamente 18.45 mg/100 g, por lo que ajustando a la dosis sugerida de 20-25 g por día como máximo, el aporte de ácido ascórbico no sería contraproducente.

Además, se ha informado que la vitamina C actúa como un acidificante urinario eficaz con efecto inhibitorio *in vitro* para la formación de los cristales de estruvita (un componente que puede ocasionar un tipo de cálculo renal), siendo un agente protector potencial para los pacientes con urolitiasis recurrente (131).

En lo que respecta al ácido L-dehidroascórbico (la forma oxidada del ácido ascórbico), se ha identificado como un agente para revertir el daño renal en ratones en senescencia (226).

### 8.1.3. Ácidos grasos

El contenido de ácidos grasos es otra característica relevante en la calidad de los productos apiarios, que pueden repercutir favorablemente en la salud general y renal. La variabilidad de los ácidos grasos, al igual que otros atributos, es dependiente del origen botánico y geográfico y de las metodologías aplicadas para el aislamiento de los mismos

(227). Todos los ácidos grasos identificados fueron corroborados por su tiempo de retención, mediante el cromatograma de los estándares (Anexo 6-9), en donde se identificaron en total 8: ácido palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico, cis-11 eicosenoico y cis-13,16-docosadienoico. El porcentaje de ácidos grasos presentes en cada muestra se enlistan en la Tabla 13.

El contenido de los ácidos grasos osciló entre 2.65 y 57.56  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , correspondiendo el valor mínimo al ácido palmitoleico en jalea real y mayor al ácido palmítico en el propóleo. En el polen, el ácido palmítico representó el 99.99% del total de los ácidos grasos (Tabla 13). De forma semejante, Margaoan et al. (228), establecieron que el ácido palmítico puede representar una proporción importante, no obstante estos autores reportaron que representó aproximadamente 30.93% en muestras de polen de Rumania.

La concentración de los ácidos grasos en el polen de abeja difiere de acuerdo con a la estación del año de donde provengan, pudiendo encontrar mayor concentración de ácido linolénico (C18:3), ácido linoleico (C18:2) en otoño, mientras que en verano tiene una concentración mayor de ácido palmítico (C16:0) y oleico (C18:1) (229), mismo que concuerda con lo reportado en este estudio que es de polen recolectado en verano.

**Tabla 13.** Contenido de ácidos grasos de productos apiaros

Muestra	Ácido graso	%
Polen	Palmítico	99.99 $\pm$ 0.000
	Oleico	0.0003 $\pm$ 0.000
	Linoleico	0.0002 $\pm$ 0.000
	Ácido cis-11-eicosenoico	0.006 $\pm$ 0.000
Jalea real	Palmitoleico	40.35 $\pm$ 0.100
	Linolénico	59.64 $\pm$ 0.102
Propóleo	Palmítico	99.53 $\pm$ 0.005
	Esteárico	0.0003 $\pm$ 0.000
	Oleico	0.46 $\pm$ 0.003
	Ácido cis-13,16 docosadienoico	0.002 $\pm$ 0.000

Con relación a la jalea real, se encontraron dos ácidos grasos (Tabla 13), correspondiendo los más altos al ácido linolénico (59.64%). La poca diversidad en este producto apiario, puede estar justificada al hecho de que una de las características distintivas en ella, es que alrededor del 80-85% son ácidos grasos libres y sólo una pequeña proporción están esterificados (230). Además, aproximadamente del 80-90% de sus ácidos grasos tienen estructura diferente como es el caso del ácido 10-hidroxi-2-decenoico (10-HDA), el ácido 10-hidroxidecenoico (10-HDDA) y el ácido sebácico (SEA) (55). Estos compuestos mencionados previamente representan hasta el 3.5% de la muestra y son considerados como parámetro de calidad estándar internacional (231–233).

Con respecto al propóleo, se observaron cuatro ácidos grasos, en donde el ácido palmítico representó el 99.53% (Tabla 13). Esto concuerda con lo reportado en muestras de Jordania, en donde este representó alrededor del 44.6% del total, seguido del ácido oleico con 24.6% (234).

Nutricionalmente hablando, la recomendación del consumo de proporciones adecuadas de omega-3 y omega-6, se basa en que las dietas actuales representan un mayor consumo de ácidos grasos omega 6, alcanzando una relación de hasta 1:20 (235). La relación óptima recomendada se fija en 3:1 a 4:1 (236). De esta manera, su consumo equilibrado se considera un factor determinante para la disminución y control de enfermedades de origen coronario, hipertensión, algunos tipos de cáncer, diabetes, entre otras (237). Por tal razón, en especial la jalea real por su contenido de ácido linolénico (163), puede ser un agente prometedor en el alimento de diseño para mejorar la relación de los ácidos grasos omega-3 en la dieta.

Dentro de la patogenia de la litiasis renal, los ácidos grasos omega-3 pueden actuar como sustratos competitivos para la serie n-6, y de esa forma reducir la excreción urinaria de calcio y de oxalato (238). Y en lo que respecta a la serie omega-9, se ha sugerido su efecto modulador de procesos inflamatorios y potencial anticancerígeno (239).

Otros componentes de importancia en el funcionamiento renal en general y en la litiasis son los minerales, los cuales desempeñan funciones específicas en su prevención o tratamiento. Los productos de la colmena contienen una gran diversidad de ellos y se describirán a continuación.



#### 8.1.4. Contenido de minerales

La composición mineral de los productos de la colmena es un reflejo de las características del entorno, de las plantas, rocas, suelo y las regiones que visitan las abejas (240–242), también se considera un indicador de contaminación del medio ambiente (243).

Desde el punto de vista de la salud, la importancia de determinar la concentración de minerales parte del hecho de que son esenciales para el buen funcionamiento del organismo ya que cumplen con funciones vitales, como la regulación de los líquidos corporales, salud cardiovascular, coagulación y salud renal, por lo tanto, deben ser aportados en los alimentos como el zinc, calcio, potasio, fósforo, sodio, hierro y magnesio (244). En contraparte, la presencia de plomo, cadmio, arsénico en los alimentos representan un riesgo para la salud humana debido a sus efectos nocivos y acumulativos (245), ocasionando alteraciones metabólicas, náuseas, dolores de cabeza (246), cáncer y alteraciones en el sistema nervioso central (247,248).

Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 14, en la que se observa una variabilidad de 19 minerales en las muestras. El conjunto de datos arrojó concentraciones en el intervalo de 0.001-367.09 mg/kg, correspondiendo el valor más alto al Na en miel, seguido de los valores de este mismo elemento en propóleo y lo más para Co identificado en miel y polen.

Con respecto al contenido de Pb, los valores más altos se identificaron en el propóleo con 3.73 mg/kg, seguido de la miel (0.67 mg/kg). En la actualidad, los niveles máximos permitidos no están establecidos, sin embargo, la Unión Europea determina un límite máximo de residuo con fines de exportación de la miel entre 0.1-1 mg/kg (249). Por tanto, la miel utilizada en el presente estudio se encuentra dentro los intervalos permitidos. Se establece, además, que su presencia puede explicarse por la incorporación no intencionada de partículas en el néctar de las abejas, derivadas del tráfico vehicular (250). Su toxicidad depende de la ruta de exposición (251), sin embargo, el *Codex Alimentarius* establece un límite de exposición de 25 µg/kg de peso corporal (252). Por tanto, el producto aportaría un aproximado de 0.55 µg en una porción de 20 g, es decir que representaría un 0.44% de este límite en un adulto promedio de 70 kg.

**Tabla 14.** Contenido de minerales de los productos apiarios (mg/kg)

Mineral	Miel	Polen	Jalea real	Propóleo
Al	0.26±0.01 <sup>c</sup>	0.58±0.03 <sup>b</sup>	0.21±0.00 <sup>d</sup>	1.16±0.00 <sup>a</sup>
Ba	0.006±0.00 <sup>b</sup>	0.005±0.00 <sup>b</sup>	0.002±0.03 <sup>c</sup>	0.04±0.00 <sup>a</sup>
Ca	3.25±0.02 <sup>c</sup>	4.27±0.09 <sup>a</sup>	2.04±0.02 <sup>d</sup>	3.69±0.01 <sup>b</sup>
Co	0.001±0.00 <sup>a</sup>	0.001±0.00 <sup>a</sup>	ND	0.002±0.00 <sup>a</sup>
Cu	0.010±0.00 <sup>d</sup>	0.02±0.00 <sup>a</sup>	0.012±0.00 <sup>c</sup>	0.014±0.00 <sup>b</sup>
Fe	2.57±0.01 <sup>b</sup>	1.85±0.03 <sup>c</sup>	1.17±0.01 <sup>d</sup>	11.99±0.02 <sup>a</sup>
K	203.37±0.95 <sup>a</sup>	134.75±2.77 <sup>b</sup>	97.6±0.33 <sup>d</sup>	102.64±0.21 <sup>c</sup>
Mg	4.23±0.03 <sup>d</sup>	13.75±0.32 <sup>a</sup>	6.10±0.05 <sup>c</sup>	7.16±0.03 <sup>b</sup>
Mn	0.16±0.00 <sup>c</sup>	0.21±0.00 <sup>b</sup>	0.05±0.00 <sup>d</sup>	0.39±0.00 <sup>a</sup>
Mo	0.03±0.00 <sup>a</sup>	0.02±0.00 <sup>a</sup>	0.01±0.00 <sup>a</sup>	0.02±0.00 <sup>a</sup>
Na	367.09±4.54 <sup>a</sup>	171.86±0.54 <sup>c</sup>	125.47±0.27 <sup>d</sup>	210.55±0.46 <sup>b</sup>
Ni	0.43±0.00 <sup>a</sup>	0.28±0.00 <sup>b</sup>	0.21±0.00 <sup>d</sup>	0.27±0.00 <sup>c</sup>
P	4.73±0.02 <sup>d</sup>	58.45±0.17 <sup>a</sup>	35.00±0.15 <sup>b</sup>	11.83±0.01 <sup>c</sup>
Pb	0.67±0.01 <sup>b</sup>	0.55±0.00 <sup>c</sup>	0.41±0.00 <sup>d</sup>	3.73±0.00 <sup>a</sup>
Sn	0.21±0.00 <sup>a</sup>	ND	ND	0.03±0.00 <sup>b</sup>
Sr	0.13±0.00 <sup>b</sup>	0.16±0.00 <sup>a</sup>	0.08±0.00 <sup>c</sup>	0.17±0.00 <sup>a</sup>
Ti	2.05±0.02 <sup>b</sup>	1.01±0.02 <sup>c</sup>	0.53±0.00 <sup>d</sup>	2.31±0.02 <sup>a</sup>
V	ND	ND	ND	0.03±0.00
Zn	0.76±0.00 <sup>c</sup>	0.85±0.00 <sup>b</sup>	0.49±0.00 <sup>d</sup>	1.01±0.05 <sup>a</sup>

<sup>a-d</sup> Indica diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0.05$ ). ND= No detectado.

Con respecto al polen, se establece que su recolección debe estar alejada al menos 3 km de zonas industriales o de áreas agrícolas manipuladas con pesticidas, para asegurar cantidades de Pb menores de 0.5 mg/kg (253). No obstante, estos hallazgos superan levemente el límite anteriormente mencionado, pero no se identificaron otros metales pesados como cadmio y arsénico.

En el contenido de K en las muestras de polen, fueron menores a los identificados en un estudio de Serbia, reportando una concentración de hasta 4230 mg/kg, magnesio en un intervalo de 503-964 mg/kg, además de otros componentes como Zn, Fe, Mn y Ca (254).

Con respecto al propóleo, el mineral predominante fue el Na, seguido por el K (102.64 mg/kg) y Fe (11.99 mg/kg), además se exhibe la presencia de V, elemento no encontrado en el resto de las muestras. Estos resultados difieren con los presentados por Matuszewska et al. (164), al reportar un menor contenido de Na y mayor concentración de Fe, en comparación al propóleo analizado. El vanadio es un mineral de transición que deriva de los combustibles fósiles, el cual puede distribuirse en el ambiente cuando se combina con el oxígeno y

contaminar las muestras de propóleo de las zonas donde las abejas llevan a cabo su recolección (255).

La importancia de analizar el perfil de minerales en el alimento de diseño radica en la relevancia clínica y nutricional que algunos de ellos pudieran tener como el Zn, el cual puede actuar como un auxiliar en la prevención y tratamiento de enfermedades virales, como el COVID-19 (256) u otras afecciones como la diarrea (257) y la depresión (258). Del mismo modo, se sabe que la deficiencia de Fe es el causante principal de anemia en el mundo (259). Por ello, un adecuado consumo de los minerales, en especial de Zn, Fe, Ca, K y Mg, contribuye positivamente a la salud humana, así entonces, los datos previamente demostraron que los productos de la colmena estudiados (miel, polen, jalea real y propóleo) como ingredientes del alimento de diseño, son una fuente valiosa de micronutrientes.

Además, entre los minerales que han demostrado un efecto benéfico en el tratamiento de la urolitiasis sobresale el Mg, ya que cuando existe una baja eliminación urinaria de este mineral se relaciona con la formación de cálculos renales, indicando que aquellos individuos con un buen aporte y por ende una mayor eliminación urinaria de Mg se asocia con menor incidencia de la enfermedad (127), deducciones similares detallan Wu et al. (260) añadiendo que este mineral puede desempeñar un papel relevante en la prevención y tratamiento de los cálculos renales. El K administrado en citrato, por su parte, reduce la recurrencia de cálculos renales de oxalato de calcio, teniendo además un efecto benéfico para su expulsión (261).

Cabe mencionar, que derivado de este análisis fue posible establecer que el alimento de diseño cubriría los siguientes % IDR en una porción de 100 g, de los principales minerales de relevancia: Ca 0.04-0.25%, Fe 1.3-2%, Mg 0.17-0.22%, Zn 0.45-0.55% y K 0.49-0.65% (262,263).

## **8.2. Parámetros fisicoquímicos durante el almacenamiento**

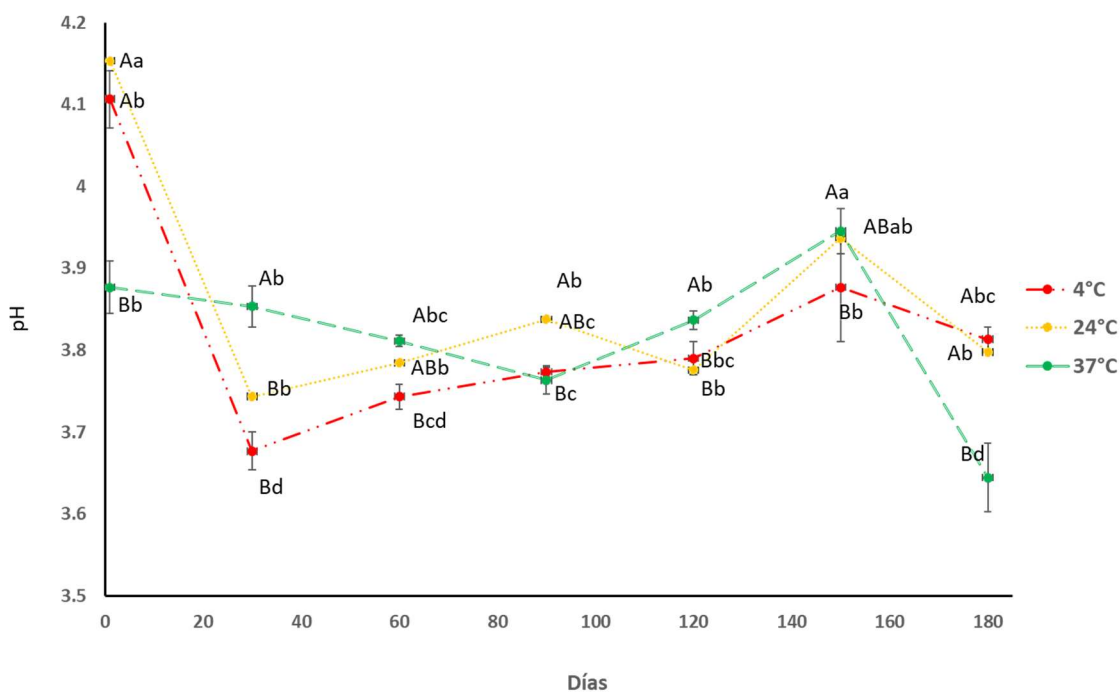
Otras características a evaluar en cualquier producto alimenticio, son sus cambios en los parámetros fisicoquímicos y su monitoreo a lo largo del tiempo, y en diversas condiciones de temperatura contribuye al establecimiento de su inocuidad y cumplimiento de los atributos necesarios que aseguren una buena calidad del mismo. Por lo que, en este apartado se

presentan los principales hallazgos sobre los cambios del alimento diseño, frente al almacenamiento, debido a que no existe evidencia un producto con las mismas materias primas, se discutirá comparando con estudios que involucren la combinación de uno o dos productos apiarios (miel-polen, miel-propóleo, etcétera), o bien con únicamente con miel puesto que es el ingrediente mayoritario, al representar 66%.

### **8.2.1. pH, acidez e HMF (hidroximetilfurfural)**

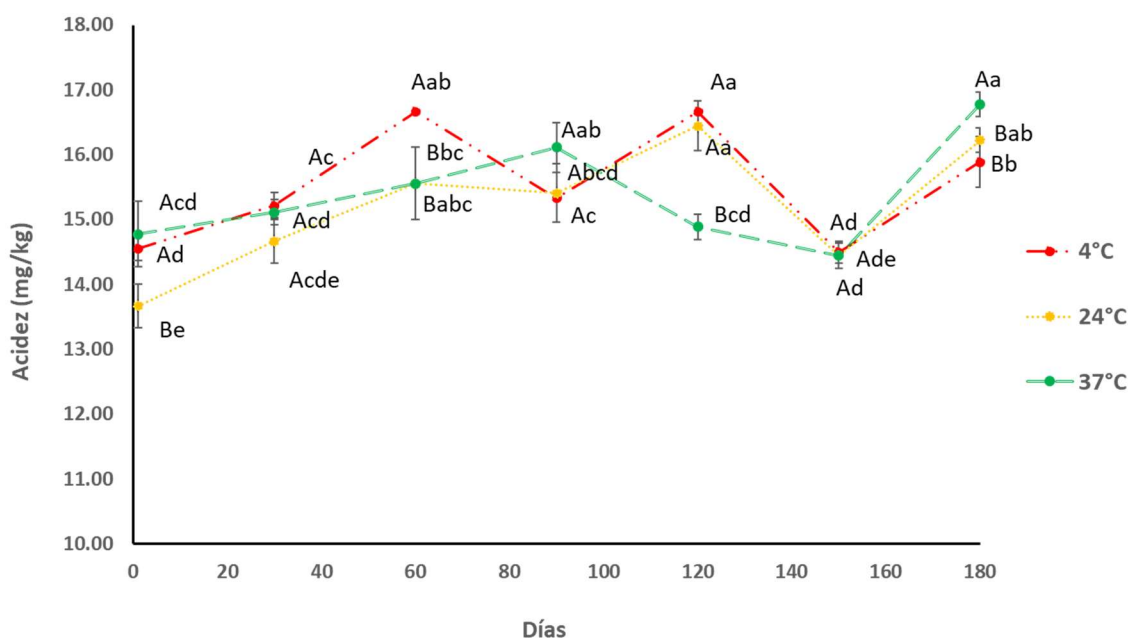
Un almacenamiento adecuado se considera fundamental para preservar la calidad de los alimentos, debido a que su composición y características se puede ver alterada por reacciones de oxidación y fermentación (264).

En la Figura 7 se muestran los valores obtenidos de pH, para la muestra almacenada a tres diferentes temperaturas (4, 24 y 37°C). El resultado fluctuó entre 3.67-4.15. Las cifras más altas se ubicaron en el día 1 para todas las temperaturas, esto puede ser atribuido a la reducción progresiva de la humedad frente al almacenamiento, generando así una concentración de los componentes responsables de la acidez como los ácidos orgánicos, dando como lugar pH más bajos (265). No obstante, comparando con el día 30, los datos demuestran que este indicador tuvo diferencias estadísticamente significativas entre las temperaturas analizadas, observando los más bajos en 4°C y 24°C. Esto fue semejante a lo mencionado por Monggudal et al. (266) en miel almacenada durante 6 meses (3.57-4.30).



**Figura 7.** Cambios de pH del alimento de diseño durante el almacenamiento. <sup>A-B</sup> Indica diferencias significativas entre las muestras por día de almacenamiento ( $p < 0.05$ ). <sup>a-d</sup> Indica diferencias significativas entre la misma muestra a diferentes días de almacenamiento ( $p < 0.05$ ).

La acidez osciló en el intervalo de 13.33-39.77 mg/kg, correspondiendo el mayor valor al día 1 del almacenamiento en 24°C, así como el más bajo en el día 30 (Figura 8). En la miel, este parámetro se considera un indicador de deterioro frente a la fermentación post cosecha (267), relacionado con la pérdida de calidad del producto y la disminución del pH (268). Estos resultados, estuvieron por debajo del límite máximo establecido por el *Codex Alimentarius* para la acidez en miel (<50 mEq/kg) (269), sugiriendo así un almacenamiento adecuado y sellado correcto de los recipientes (270).



**Figura 8.** Acidez del alimento de diseño en el almacenamiento. <sup>A-B</sup> Indica diferencias significativas entre las muestras por día de almacenamiento ( $p < 0.05$ ) <sup>a-d</sup> Indica diferencias significativas entre la misma muestra a diferentes días de almacenamiento ( $p < 0.05$ ).

La tendencia observada para este indicador (Figura 8) es debido al contenido de ácidos orgánicos, (especialmente el ácido glucónico) que, en equilibrio con ésteres y lactonas ocasionan cambios en este parámetro (271). A su vez, este mecanismo en conjunto con los valores de pH refleja las modificaciones que el alimento presenta por la descomposición de proteínas, grasas y otros elementos, acción de enzimas, produciendo gases ácidos y alcalinos (272), los cuales son liberados a medida que transcurre el almacenamiento ocasionando fluctuaciones (273). Finalmente, el comportamiento encontrado, fue semejante al reportado por Da Silva en muestras de miel (274).

Por último, el contenido de hidroximetilfurfural (HMF), fue dependiente de los días de almacenamiento y la temperatura, manifestando un aumento gradual en todas las condiciones con cifras de hasta 1115.75 mg/kg (Tabla 15). Se puede observar que las cifras finales fueron 3.88, 7.34 y 297 veces mayores (4°C, 24°C y 37°C, respectivamente), con el día 1.

La importancia de medir y establecer las mejores condiciones para la regulación del HMF, se debe a que el consumo de productos que lo contienen puede ocasionar efectos negativos en la salud humana como genotoxicidad, carcinogenicidad (275) y citotoxicidad (276). Se estima que su consumo en una dieta promedio es de 2.5mg/kg/día (277), por lo que un exceso en la ingesta de este puede repercutir desfavorablemente en la salud.

Por otro lado, el *Codex Alimentarius* establece un límite máximo en la miel de zona no tropical de 40 mg/kg (278). Con base en ello, se observó que los valores en el producto almacenado a 4°C y 24°C se mantuvieron dentro de lo establecido, no siendo así en la muestra a 37°C, la cual lo superó después del día 30 de almacenamiento (Tabla 15).

Las concentraciones más bajas de HMF se hallaron en la muestra almacenada a 4°C. Este mecanismo se debe a que las bajas temperaturas retrasan la degradación de los alimentos, limitando las reacciones químicas (279). Además, la producción del HMF se ve altamente favorecida por la presencia de otros compuestos como los oligosacáridos y polisacáridos, que ocasionan la formación de cetohechosas, por medio de la hidrólisis (280). Por tanto, el contenido de HMF del producto, pudo haber sido influenciado por la temperatura del almacenamiento y por el contenido de fructosa.

**Tabla 15.** HMF (mg/kg) del alimento de diseño durante el almacenamiento

Día	4°C	24°C	37°C
1	2.20±0.09 <sup>Be</sup>	2.26±0.10 <sup>Bf</sup>	3.95±0.25 <sup>Ad</sup>
30	3.52±0.08 <sup>Bd</sup>	3.80±0.21 <sup>Be</sup>	31.89±3.13 <sup>Ad</sup>
60	5.53±0.40 <sup>Bc</sup>	6.38±0.29 <sup>Bd</sup>	375.27±3.12 <sup>Ac</sup>
90	5.76±0.03 <sup>Bc</sup>	8.73±0.23 <sup>Bc</sup>	670.10±5.29 <sup>Ab</sup>
120	7.09±0.01 <sup>Bb</sup>	11.41±0.40 <sup>Bb</sup>	1115.75±69.07 <sup>Aa</sup>
150	8.23±0.75 <sup>Ba</sup>	11.75±0.52 <sup>Bb</sup>	1104.78±74.79 <sup>Aa</sup>
180	8.55±0.29 <sup>Ba</sup>	16.61±0.20 <sup>Ba</sup>	1175.24±27.96 <sup>Aa</sup>

<sup>A-B</sup> Indica diferencias significativas entre las muestras por día de almacenamiento ( $p < 0.05$ ). <sup>a-d</sup> Indica diferencias significativas entre la misma muestra a diferentes días de almacenamiento ( $p < 0.05$ ).

El comportamiento de la muestra a 37°C, fue similar a un estudio de almacenamiento de miel a 35°C durante 9 meses, alcanzando 353.09 mg/kg (281). Otro estudio también analizó el efecto de la temperatura en miel almacenada 24 meses a 3 temperaturas (4°C, 25°C y 35°C), encontrando mayores alteraciones en la temperatura más alta (282), superando los

límites establecidos por el *Codex Alimentarius*. Por otra parte, la incorporación de los otros constituyentes (productos apiarios), pudo haber incrementado el contenido de HMF *per se*. Juszczak et al. (283), evaluaron el impacto de la incorporación de polen, jalea real o propóleo a muestras de miel sobre la concentración de HMF e indicaron que estos generan influencia en el siguiente orden polen>jalea real>propóleo.

### 8.2.2. Actividad de agua ( $a_w$ )

El monitoreo de la  $a_w$  en los alimentos contribuye a describir la influencia del agua sobre reacciones que inducen deterioro físico y químico (284). La  $a_w$  en soluciones acuosas de azúcar (como la miel) se ve afectada por la concentración e interacciones agua-agua, azúcar-azúcar y agua-azúcar, así como la temperatura (285).

Las levaduras osmofílicas son las responsables de la fermentación en la miel, las cuales pueden crecer hasta en una  $a_w$  de aproximadamente 0.6, por tanto, un valor cercano a esta cifra indicaría la predisposición para el crecimiento de levaduras y fermentación (286). Los resultados estuvieron en el rango de 0.593-0.683 (Tabla 16), encontrando que, en la muestra almacenada a 4°C, fue la condición donde exhibió una tendencia al aumento conforme los días de almacenamiento. Sin embargo, comparando por cada temperatura en el inicio y final del almacenamiento, la  $a_w$  fue mayor significativamente en el día 120 (especialmente en la condición de 4°C), esto indicaría que el incremento gradual estaría relacionado con la cantidad de glucosa cristalizada (166).

**Tabla 16.** Resultados de  $a_w$  del alimento de diseño durante el almacenamiento

Día	4°C	24°C	37°C
1	0.593±0.002 <sup>Ad</sup>	0.593±0.002 <sup>Af</sup>	0.593±0.002 <sup>Ad</sup>
30	0.666±0.003 <sup>Ac</sup>	0.666±0.003 <sup>Ac</sup>	0.666±0.003 <sup>Ab</sup>
60	0.679±0.001 <sup>Ab</sup>	0.655±0.001 <sup>Bd</sup>	0.604±0.001 <sup>Cc</sup>
90	0.679±0.001 <sup>Bb</sup>	0.683±0.002 <sup>Aa</sup>	0.671±0.001 <sup>Cb</sup>
120	0.681±0.001 <sup>Ab</sup>	0.645±0.002 <sup>Be</sup>	0.677±0.002 <sup>Aa</sup>
150	0.689±0.001 <sup>Aa</sup>	0.667±0.002 <sup>Bb</sup>	0.668±0.001 <sup>Cc</sup>
180	0.678±0.001 <sup>Ab</sup>	0.667±0.001 <sup>Bbc</sup>	0.668±0.001 <sup>Bb</sup>

<sup>A-C</sup> Indica diferencias significativas entre las muestras por día de almacenamiento ( $p<0.05$ ). <sup>a-c</sup> Indica diferencias significativas entre la misma muestra a diferentes días de almacenamiento ( $p<0.05$ ).



Este proceso de cristalización facilita la formación de monohidrato de glucosa, dando lugar a la liberación del agua de hidratación, resultando en una ganancia neta del agua activa en la solución (286,287), ello explicaría el comportamiento encontrado en la muestra frente al almacenamiento.

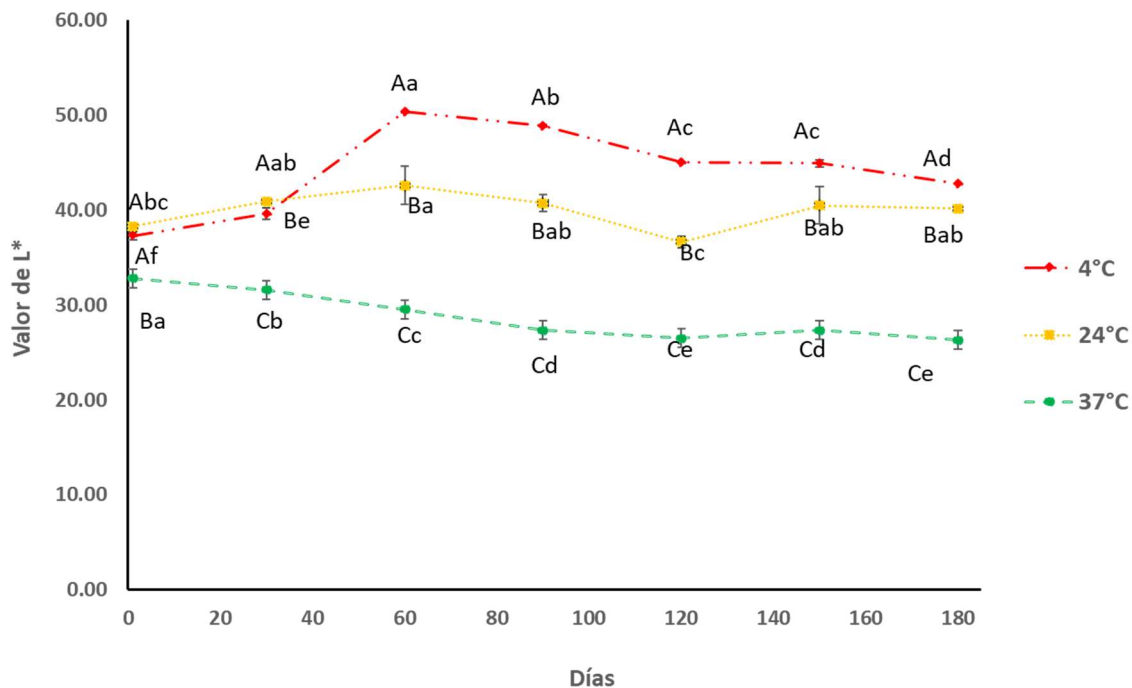
Se ha evaluado este parámetro en muestras de miel encontrando un valor de 0.470 a 0.589 (288), siendo similares con la muestra durante el primer día de almacenaje. No obstante, las variaciones y comportamiento observado, puede deberse a la adición de las otras materias primas. Por ejemplo, se ha descrito que el propóleo en extracto puede alcanzar una  $a_w$  de hasta 0.876 (289), por tanto al ser un componente del alimento de diseño pudo haber modificado este indicador.

### **8.2.3. Evaluación del color**

Los resultados obtenidos del producto a lo largo del tiempo y a las diferentes temperaturas se muestran en las Figuras 9-13. Se observa un patrón cambiante para los puntajes de luminosidad ( $L^*$ ), a lo largo del tiempo y por temperaturas, los más bajos significativamente, correspondieron al alimento de diseño almacenado a 37°C, mientras que en el de 4°C fueron mayores. Las muestras durante el almacenamiento mantuvieron este parámetro de manera similar, con una ligera tendencia a disminuir en el último día. El producto analizado (alimento de diseño, día 1-120), exhibió cifras en el intervalo de 26.54-50.36.

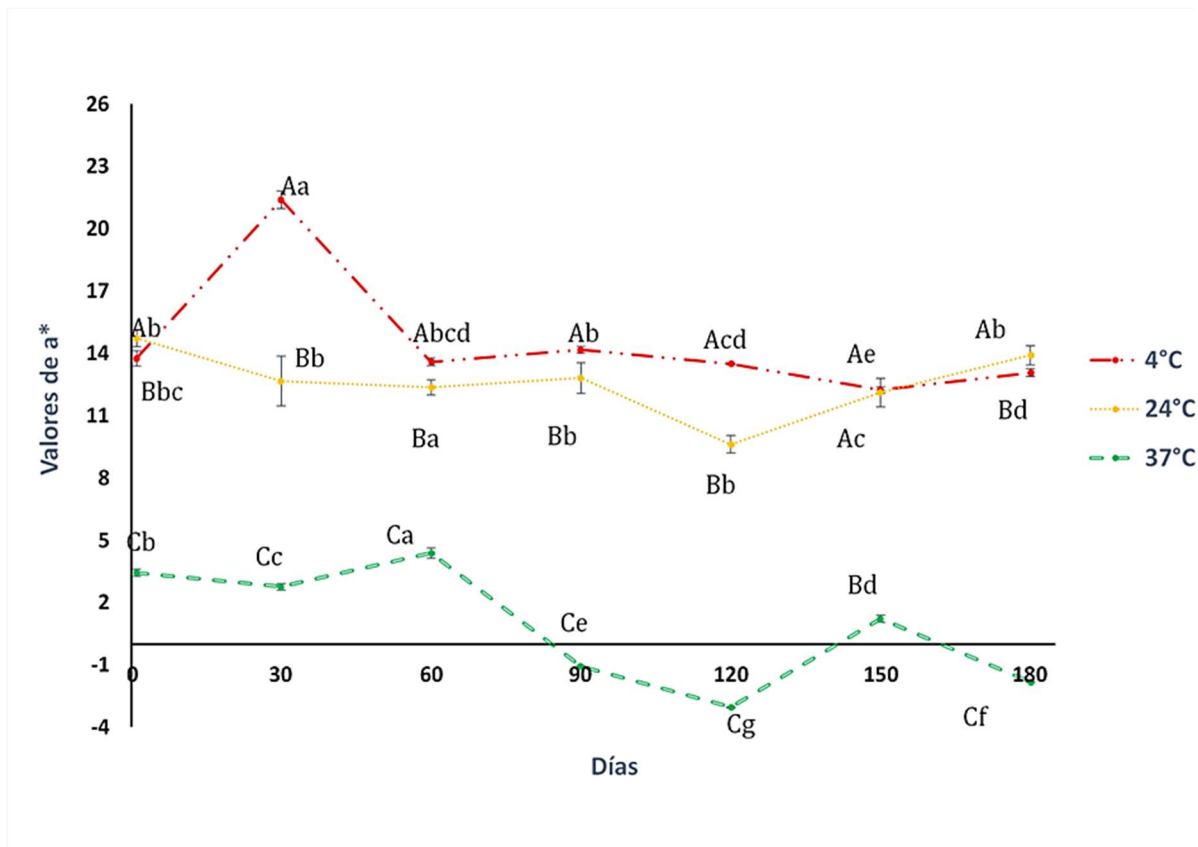
La mayor tasa de cambio de la luminosidad en la muestra a 37°C, pudo deberse al efecto que ejerció la temperatura, en conjunto con algunos otros cambios como el contenido de humedad o la oxidación de los polifenoles (290), caramelización, reacciones de Maillard (291) y la reducción de los azúcares que influyen en esta reacción (292).

Por su lado, en la muestra a 24°C, las cifras se mantuvieron relativamente constantes, con pocos cambios (Figura 9). Similar comportamiento fue descrito por Piotraszewska-Pajak y Gliszczynska-Swiglo (293), los cuales almacenaron miel polaca a temperatura ambiente, durante 9 meses y encontraron que esta condición no alteró la luminosidad.



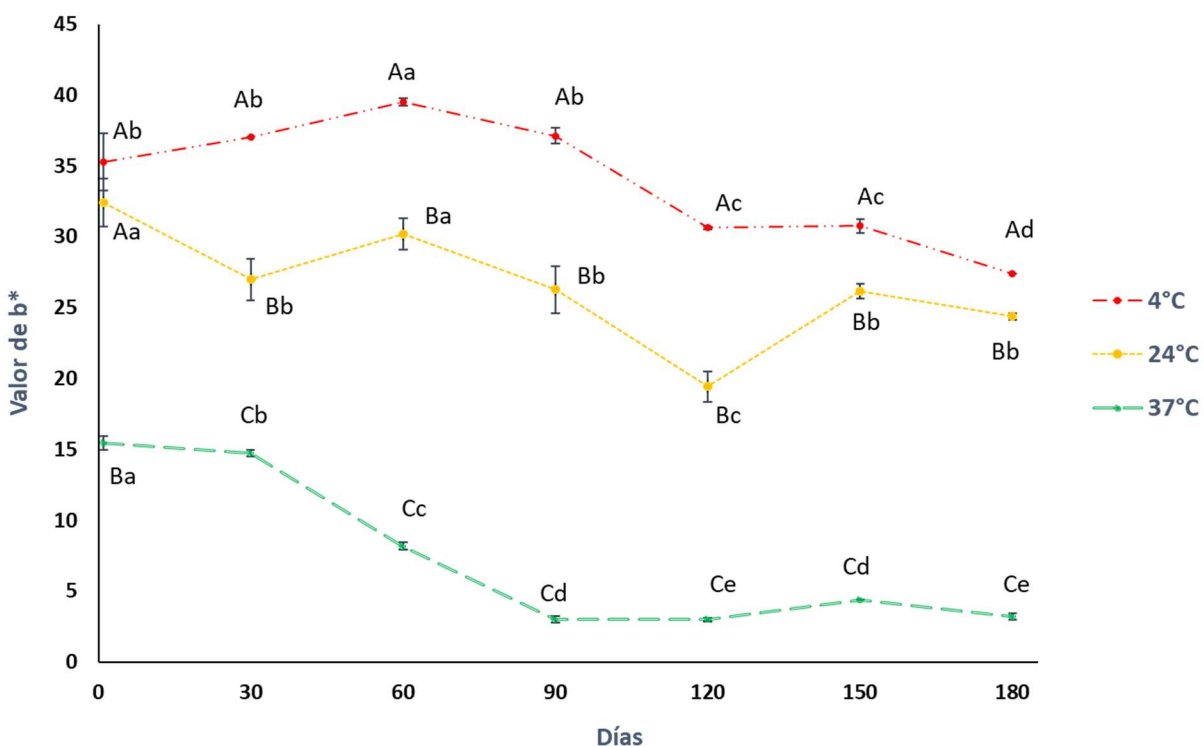
**Figura 9.** Luminosidad del alimento de diseño durante el almacenamiento. <sup>A-C</sup> Indica diferencias significativas entre las muestras por día de almacenamiento ( $p < 0.05$ ). <sup>a-f</sup> Indica diferencias significativas entre la misma muestra a diferentes días de almacenamiento ( $p < 0.05$ ).

En lo que respecta a la coordenada  $a^*$  (Figura 10). El alimento de diseño a 4°C y 24°C exhibieron puntajes positivos ( $+a^*$ ), que indica coloración roja. En contraparte, las cifras más bajas significativamente correspondieron a 37°C (-3.04), en donde además se puede apreciar que a esta temperatura en los primeros 60 días, se identificaron valores positivos y posteriormente, se cambiaron a la tendencia verde.



**Figura 10.** Valores de  $a^*$  del alimento de diseño en el almacenamiento. <sup>A-C</sup> Indica diferencias significativas entre las muestras por día de almacenamiento ( $p < 0.05$ ). <sup>a-g</sup> Indica diferencias significativas entre la misma muestra a diferentes días de almacenamiento ( $p < 0.05$ ).

Similar comportamiento tuvo la muestra a 37°C en la coordenada  $b^*$  (Figura 11). Los más altos significativamente, se aprecian en la muestra a 4°C en todos los días del almacenamiento, mientras que los más bajos corresponden al conservado a 37°C. Estas diferencias se pueden deber a que las dos primeras temperaturas (4 y 24°C), presentaban mayor cristalización, por ende, presentaban cambios en las propiedades ópticas del producto, generando mayor presencia de cristales finos (292), dando como resultado cifras más altas.

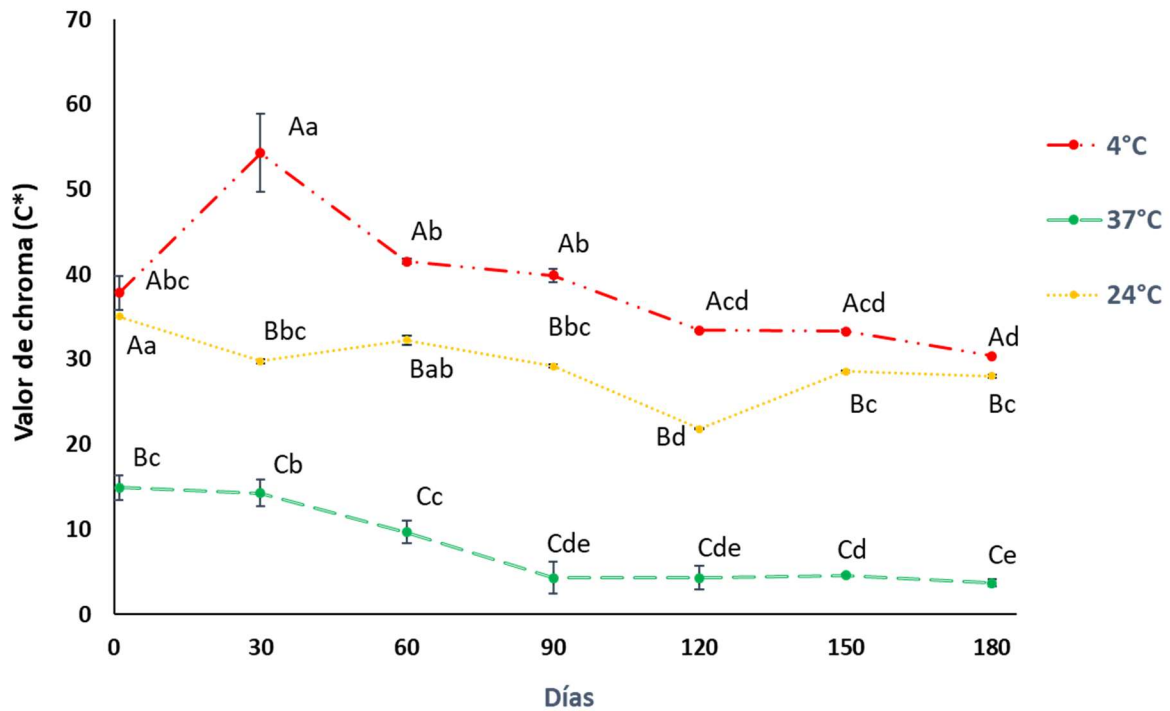


**Figura 11.** Valores de  $b^*$  del alimento de diseño en el almacenamiento. <sup>A-C</sup> Indica diferencias significativas entre las muestras por día de almacenamiento ( $p < 0.05$ ). <sup>a-e</sup> Indica diferencias significativas entre la misma muestra a diferentes días de almacenamiento ( $p < 0.05$ ).

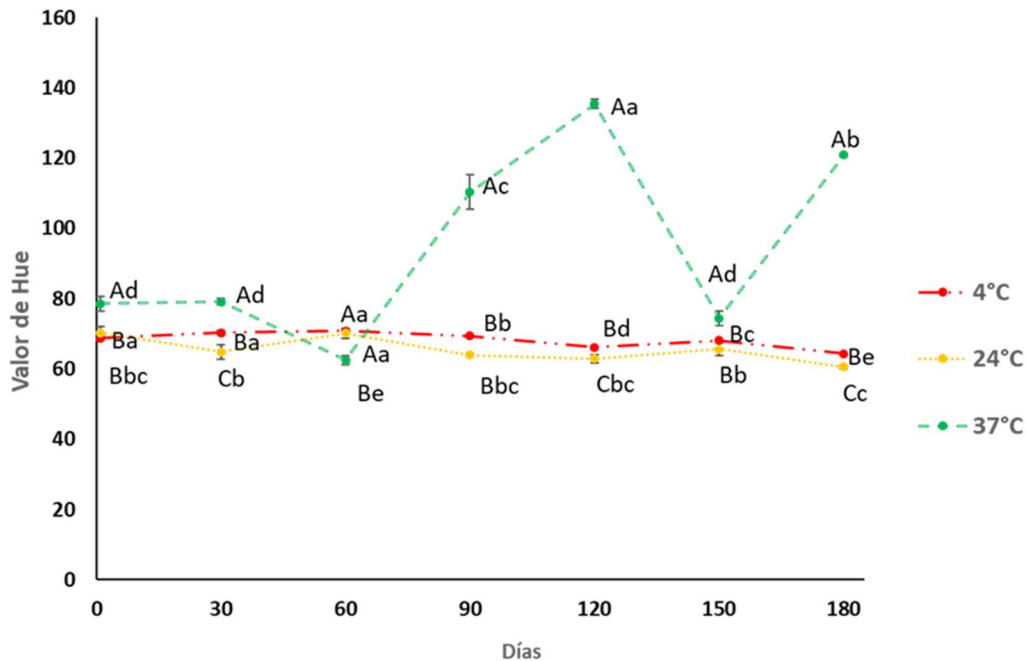
Por otra parte, los valores de croma ( $C^*$ ) en las muestras (Figura 12), tuvieron una tendencia variable en las diferentes temperaturas, manifestando que la muestra de 24°C y 37°C, fueron más marcada hacia la disminución, al comparar el dato inicial y transcurridos los 180 días, pasando de 35.05 a 21.84 y de 14.97 a 4.27, respectivamente, indicando cambios en la pureza del color. Por otro lado, el mantenimiento de estos en lo positivo, indica una dispersión de la luz en el cuadrante I, correspondiendo a componentes amarillo y rojos mayoritariamente (294). No obstante, se puede apreciar que, al aumentar la temperatura se presentó un decremento del valor. Esto pudiera sugerir degradación de algunos pigmentos como el betacaroteno (295), aunado a la reducción progresiva del puntaje de  $a^*$  y  $b^*$  (296).

El ángulo  $hue$  ( $^{\circ}h$ ) osciló entre 62.58-135.46, correspondiendo el mínimo y máximo al producto a 37°C, al día 60 y 120, respectivamente (Figura 13), además al comparar por días de almacenamiento, las cifras más altas siempre se identificaron en la muestra a 37°C. En consecuencia, se deduce que aquellos con una cifra entre 10-80°, se ubicarían en el primer

cuadrante con tonalidad de naranja-rojizo a amarillo-anaranjado, indicando una saturación de media a baja (297), por ende, cuando esto se ve superado, las muestras estarían más saturadas (nivel de moderado a alto).



**Figura 12.** Valores de Chroma del alimento de diseño durante el almacenamiento. <sup>A-C</sup> Indica diferencias significativas entre las muestras por día de almacenamiento ( $p < 0.05$ ). <sup>a-e</sup> Indica diferencias significativas entre la misma muestra a diferentes días de almacenamiento ( $p < 0.05$ ).



**Figura 13.** Valores de *hue* en el almacenamiento. <sup>A-C</sup> Indica diferencias significativas entre las muestras por día de almacenamiento ( $p < 0.05$ ). <sup>a-d</sup> Indica diferencias significativas entre la misma muestra a diferentes días de almacenamiento ( $p < 0.05$ ).

#### 8.2.4. Efecto de la temperatura sobre los parámetros de calidad del producto

Los modelos cinéticos en alimentos, es un proceso que facilita el análisis de las condiciones de procesamiento sobre parámetros críticos de calidad, con el objetivo de minimizar los efectos no deseados y optimizar su calidad (298). Para poder describir la influencia de la temperatura sobre el deterioro de los alimentos, es necesario la determinación de la constante de reacción y la energía de activación, todo ello se obtiene mediante análisis de regresión (299).

El modelamiento cinético se aplicó para todos los atributos que se evaluaron durante el almacenamiento, sin embargo, solo para HMF (hidroximetilfurfural) se obtuvieron coeficientes con mejor ajuste. Esto puede ser debido a que este componente ha sido reconocido como un factor crítico para evaluar el deterioro en algunos alimentos a causa del calentamiento excesivo o durante condiciones de almacenamiento inadecuadas (300).

En la tabla 17, se presenta el coeficiente de regresión para las diferentes temperaturas y su ecuación correspondiente obtenida mediante regresión lineal de HMF. Los más altos ( $R^2$ ) se obtuvieron para el orden cero con 0.9712, 0.9791 y 0.9418 para las muestras almacenadas a 4, 24 y 37°C, respectivamente. Este mismo comportamiento ha sido mencionado en otras investigaciones, manifestando que la cinética de formación del HMF corresponde a orden cero (301–303), lo que indicaría que la formación de este compuesto no es dependiente de la concentración inicial de algún componente del producto (304).

**Tabla 17.** Coeficientes de regresión lineal a diferentes temperaturas

Orden de reacción	Temperatura de almacenamiento		
	4°C	24°C	37°C
	$R^2$	$R^2$	$R^2$
Cero	0.9712	0.9791	0.9418
Primer	0.9046	0.9479	0.8078
Segundo	0.8044	0.8182	0.4990

Mediante la linealización de los resultados (Anexo 10), se determinó la constante de velocidad ( $k$ ) ( $m=k$ ), las cuales se muestran en la Tabla 18. Las más bajas se identificaron en el producto almacenado a 4°C, indicando que la formación de HMF, se mantiene más estable en esta condición respecto al resto de las temperaturas.

Para el tiempo de vida media (Tabla 18), la condición de 4°C evidenció los valores más altos, mientras que a medida que la temperatura de almacenamiento fue mayor, el tiempo de vida fue disminuyendo. Esto puede deberse a los cambios en los azúcares reductores durante el almacenamiento, por lo que estos componentes se acumulan más rápido a temperaturas más altas, impactando en el tiempo de vida media (305). Además, cabe mencionar que este mecanismo tiene su explicación en la deshidratación de los azúcares (principalmente fructosa) (306).

**Tabla 18.** Constantes de velocidad ( $k$ ) y tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) del producto

Temperatura (°C)	$k$	$t_{1/2}$ (días)
4	$3.69 \times 10^{-2}$	29.81
24	$7.55 \times 10^{-2}$	14.57
37	7.5205	0.23

**Tabla 19.** Cálculo para determinar el efecto de la temperatura en el HMF (con ecuación de Arrhenius)

T (K)	T (°C)	1/T (1/K)	k	Ln k
277.15	4	3.6x10 <sup>-3</sup>	3.69x10 <sup>-2</sup>	-3.2995
297.15	24	3.3x10 <sup>-3</sup>	7.55x10 <sup>-2</sup>	-2.5836
310.15	37	3.2x10 <sup>-3</sup>	7.5205	2.0176

Conociendo las constantes de velocidad de deterioro, se calculó el Ln  $k$  y  $1/T$  (K) (Tabla 19) y posteriormente se graficó (Ln  $k$  versus  $1/T$ ), para conocer la energía de activación, obteniendo un valor de  $E_a$  de 105246.92 kJ mol<sup>-1</sup> (1.0524692x 10<sup>5</sup> kJ mol<sup>-1</sup>). Este resultado fue menor a lo informado por López-Rodríguez (307) y Lazcano et al. (308), en miel originaria de Oaxaca y Puebla, México, respectivamente. Lo cual significa que la reacción del HMF se lleva a cabo con mayor rapidez en alimento de diseño comparado con muestras de miel. Esto puede deberse a las diferencias del producto en el contenido de ácido ascórbico y de ácidos orgánicos (309).

#### 8.2.5. Evaluación sensorial

Los atributos sensoriales se consideran elementos primordiales que el consumidor aprecia y observa desde el primer contacto con los productos alimenticios, habitualmente las evaluaciones sensoriales se categorizan a partir de diversos descriptores para identificar características más específicas (310).

Por otro lado, el almacenamiento prolongado puede causar la aparición de aromas y sabores diferentes afectando su calidad sensorial (311). Algunos aromas indeseables, están relacionados a reacciones de caramelización y de Maillard influenciadas por la temperatura a la que se almacena (312). Este análisis se realizó con la finalidad de conocer y monitorear los atributos sensoriales del alimento de diseño, durante un almacenamiento prolongado. El promedio de edad de los panelistas se encontró en el intervalo de 23 a 57 años (media de 40.88±12.03 años), de los cuales el 73.07% fueron mujeres y el 26.92% hombres.

En la Figura 15, se muestra el comparativo durante el almacenamiento de los descriptores del examen visual, olfativo, gustativo y táctil del alimento de diseño (con un



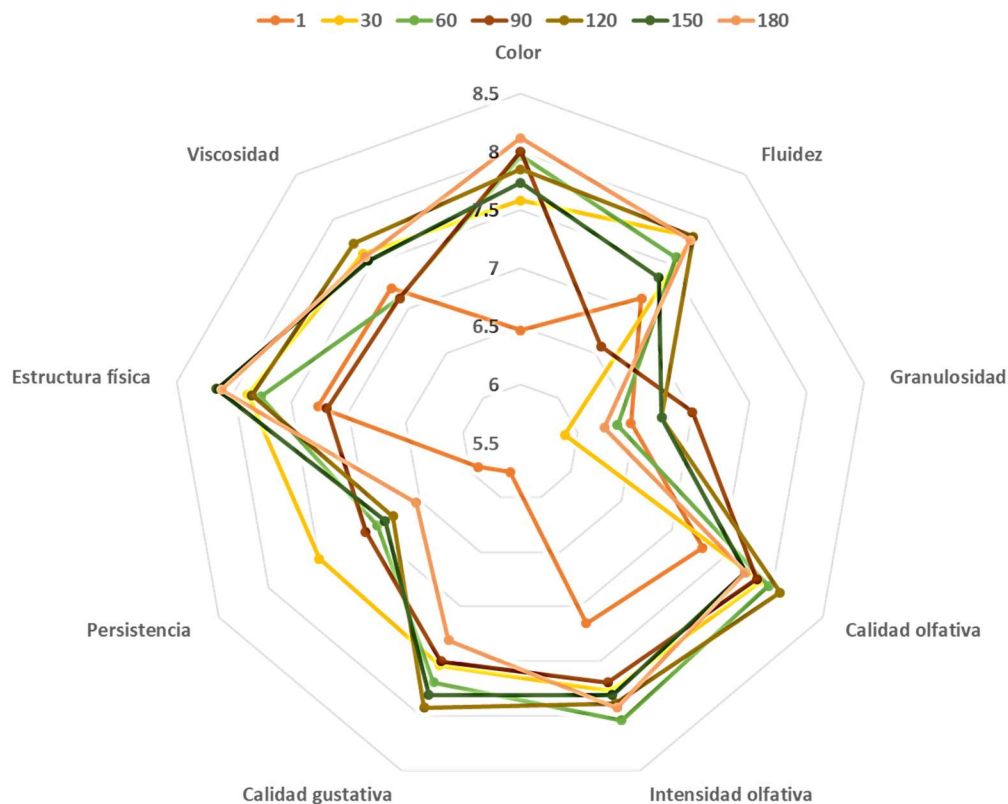
total de 9 atributos (color, fluidez, granulosis, calidad e intensidad olfativa, calidad gustativa, persistencia, estructura física y viscosidad).

En lo general, se aprecia que el nivel de aceptación del producto fue menor en el día 1 en comparación al resto de los días, ya que se identificaron valores más bajos para 5 de 9 atributos ( $6.46 \pm 1.43$  para color,  $7.37 \pm 1.99$  de calidad olfativa,  $7.15 \pm 1.80$  en la intensidad olfativa, calidad gustativa con  $5.76 \pm 2.61$  y persistencia ( $5.92 \pm 3.04$ )). En contraparte, se obtuvieron cifras más altas en 4 de 9 parámetros en el día 120, los que correspondieron a fluidez, calidad olfativa, gustativa y viscosidad ( $7.80 \pm 1.44$ ,  $8.07 \pm 0.97$ ,  $7.92 \pm 1.19$  y  $7.73 \pm 1.97$ , respectivamente).

En lo que respecta al examen visual, se puede observar que los panelistas refirieron puntajes similares en los diferentes días de almacenamiento en la fluidez y color, encontrando nivel de agrado mayor para la primera característica en el día 120 y en 180 para color, esto pudiera indicar que una menor cristalización se relaciona con un color más agradable. Esto concuerda con lo reportado por Patrignani et al. (313), en mieles de Argentina

Por otra parte, la granulosis hace referencia a la percepción del tamaño de gránulos o cristales que se distinguen en el producto, mismo que repercute en la primera impresión visual (314). En el presente estudio, en todos los períodos analizados se denotaron similares cifras de nivel de agrado (exceptuando el día 30 y 90).

Según Patrignani et al. (313), la granularidad está correlacionada con el contenido de HMF. Esto coincide con lo obtenido en HMF en el presente estudio, ya que a medida que incrementó, la granularidad también lo hizo. A su vez, se ha informado, que una mezcla de miel con 25% de polen, reduce la uniformidad y la claridad, asociada a un incremento de la adhesividad y mayor arenosidad (315).



**Figura 14.** Nivel de agrado del alimento de diseño durante el almacenamiento.

Para los atributos olfativos (calidad e intensidad olfativa), se encontraron ligeros cambios positivos en los puntajes de calidad e intensidad del olor, con una tendencia poco variable entre los diferentes días a partir del día 30, similar efecto se puede apreciar en el examen gustativo, donde se observó un mejoramiento en la aceptación del retrogusto, indicando una menor percepción de característica por los panelistas.

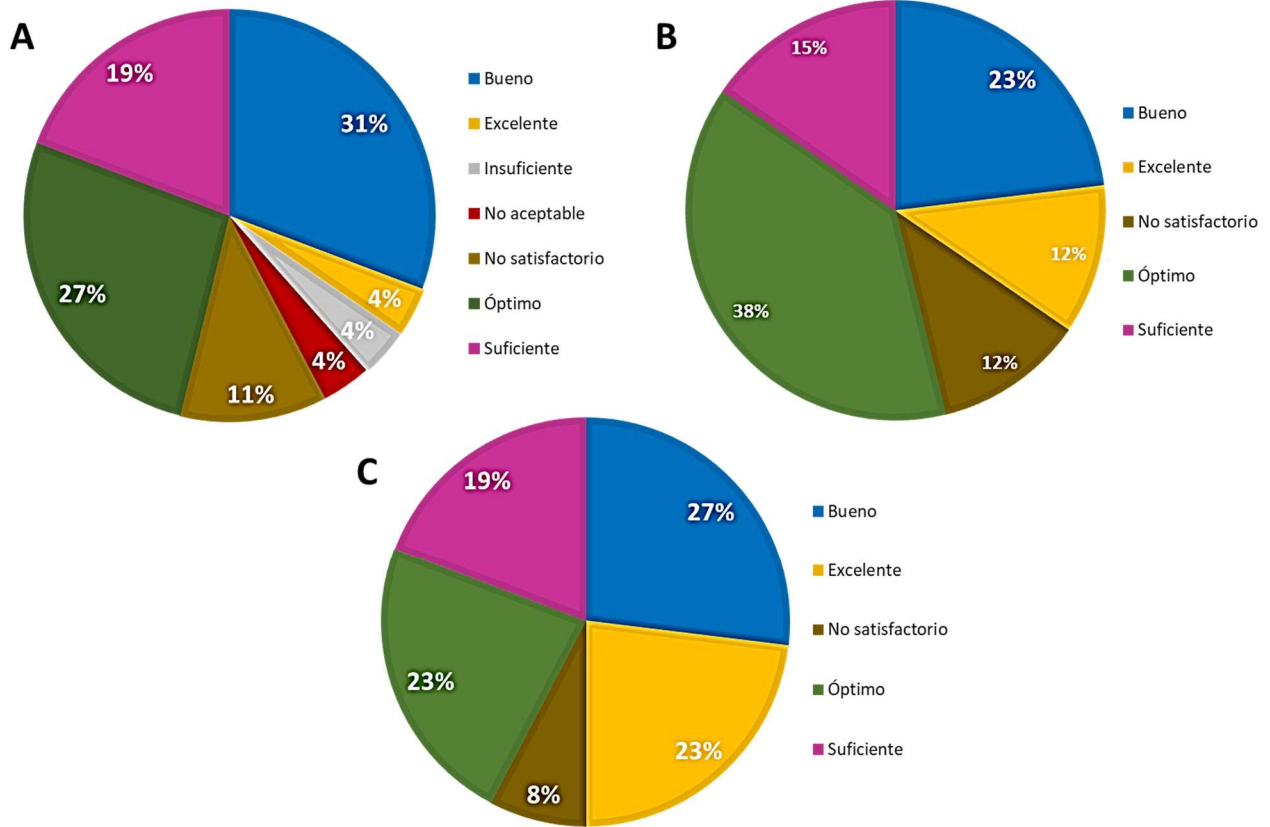
Los puntajes del examen gustativo y táctil, fueron incrementando gradualmente su nivel de aceptación, sugiriendo así, un potencial de compra por consumidores habituales de miel. Esto se asocia con lo manifestado en un estudio sensorial, aplicado en muestras de miel originarias de Eslovaquia, en donde menciona que el criterio más importante para la decisión de compra, está asociado a la consistencia, prefiriendo aquellas con más fluidez (316).

La aceptabilidad general de un producto, es dependiente de la sensación que el panelista experimenta al evaluar un alimento, la cual se ve influida por las condiciones culturales y económicas (317), por esta razón se recomienda que las pruebas de nivel de agrado se apliquen a consumidores para determinar el grado de afinidad del producto como indicativo real de compra (318). La suma de puntaje del nivel de agrado de las diversas categorías y atributos contribuyó a la valoración de la aceptación general del alimento de diseño, en características que iban desde “no aceptable” (puntaje total <32) a “excelente” (>78). Los cambios más representativos (día 1, 90 y 180), se muestran en la Figura 20 y el resto de los períodos (30, 60, 120 y 150) analizados en el Anexo 11.

El puntaje general se categorizó como bueno, no obstante, algunos participantes refirieron percibir un sabor amargo en el producto en especial en los primeros días del almacenamiento, esto podría estar influenciados por los fenoles, ya que además de ser un causal de la percepción de la astringencia, olor y sabor de los alimentos, también en el amargor (319). Por otra parte, la incorporación del propóleo le puede conferir a los alimentos un sabor amargo y pungente, debido a un compuesto llamado artemillina C (320). Esto concuerda con lo mencionado por Habryka et al. (321), al informar que la adición de propóleo a la miel, puede modificar la turbidez al mismo tiempo que ocasiona presencia de regusto, disminución del sabor dulce, especialmente cuando se adiciona en proporciones superiores a 0.5%.

Las categorías denominadas “insuficiente” y “no aceptable” se encontraron en 4% al inicio del almacenamiento (día 1), sin embargo, se enmascararon en el período intermedio (día 90) y final (día 180). De forma semejante, la categoría de “no satisfactorio”, tuvo un decremento al término del análisis, cambiando de 11% a 8% (Figura 16), por tanto, lo anterior sugiere que los puntajes de juicio mejoraron al finalizar el almacenamiento, causando un incremento en la aceptación.

En cuanto al juicio de defectos visuales, se observa en la tabla 20 que la categoría de “ausentes” fluctuó en el intervalo de 57.7-88.46%, correspondiendo este valor más alto a la proporción de panelistas que refirieron que la muestra no tenía estos defectos en el día 120. Por otra parte, 26.9% de los evaluadores encontraron al día 1 defectos leves, siendo el porcentaje mayor durante todos los días del almacenamiento.



**Figura 15.** Categorías generales de aceptación. A: Día 1. B: Día 90. C: Día 180.

**Tabla 20.** Percepción de juicio de defectos visuales.

Día	Ausentes		Apenas perceptibles		Leves		Presentes		Graves	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
1	15	57.70	3	11.5	7	26.90	1	3.80	0	0
30	18	69.20	3	11.5	5	19.20	0	0.00	0	0
60	21	80.80	2	7.70	0	0.00	3	11.50	0	0
90	22	84.62	3	11.50	0	0.00	1	3.80	0	0
120	23	88.46	2	7.70	1	3.80	0	0.00	0	0
150	22	84.46	3	11.50	1	3.80	0	0.00	0	0
180	22	84.62	2	7.70	0	0.00	1	3.80	1	3.80

**Tabla 21.** Percepción de juicio de defectos olfativos.

Día	Ausentes		Apenas perceptibles		Leves		Presentes		Graves	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
1	19	73.08	4	15.40	1	3.80	2	7.70	0	0
30	16	61.54	5	19.20	3	11.50	2	7.70	0	0
60	21	80.77	2	7.70	3	11.50	0	0.00	0	0
90	21	80.77	4	15.40	0	0.00	1	3.80	0	0
120	23	88.46	2	7.70	1	3.80	0	0.00	0	0
150	23	88.46	2	7.70	1	3.80	0	0.00	0	0
180	22	84.62	2	7.70	0	0	1	3.80	1	3.80

Respecto a los defectos olfativos, se observó una tendencia hacia el mejoramiento del juicio ya que al final del almacenamiento la ausencia correspondió al 84.62% (exceptuando el día 30), mientras el porcentaje superior se percibió en los días 30 y 60 para la categoría de “leves”, no obstante, en el día 180, el 3.8% de los panelistas refirió que tenía defectos “graves” (Tabla 21).

Para los gustativos, se encontró que este indicador presentó defectos leves percibidos en todos los días de almacenamiento, correspondiendo la más alta proporción en el día 1 (Tabla 22). Sin embargo, se identificó una tendencia de desaparición de los defectos ya que su ausencia se percibió en un 30.76% más al final del almacenamiento.

La Tabla 23, demuestra que los panelistas percibieron menos defectos táctiles presentes en el día 120, en cambio, en los días 90, 150 y 180, 3.8% encontraron graves imperfecciones en la muestra asociados a “pegajosidad excesiva no agradable”. En cuanto a los defectos leves la mayor proporción de esta categoría correspondió al día 30.

**Tabla 22.** Percepción de juicio de defectos gustativos.

Día	Ausentes		Apenas perceptibles		Leves		Presentes		Graves	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
1	9	34.62	3	11.5	4	15.40	4	15.40	6	23.10
30	14	53.85	2	7.7	5	19.20	5	19.20	0	0
60	15	57.69	4	15.4	3	11.50	3	11.50	1	3.80
90	17	65.38	3	11.5	3	11.50	2	7.70	1	3.80
120	16	61.54	4	15.4	3	11.50	3	11.50	0	0
150	18	69.23	3	11.5	3	11.50	1	3.80	1	3.80
180	17	65.38	1	3.8	4	15.40	2	7.70	2	7.70

**Tabla 23.** Percepción de juicio de defectos táctiles.

Día	Ausentes		Apenas perceptibles		Leves		Presentes		Graves	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
1	16	61.54	5	19.20	4	15.40	1	3.80	0	0
30	15	57.69	5	19.20	6	23.10	0	0.00	0	0
60	20	76.92	3	11.50	2	7.70	1	3.80	0	0
90	20	76.92	2	7.70	2	7.70	1	3.80	1	3.80
120	21	80.77	2	7.70	1	3.80	2	7.70	0	0
150	18	69.23	5	19.20	1	3.80	1	3.80	1	3.80
180	20	76.92	2	7.70	2	7.70	1	3.80	1	3.80

Con respecto a los aromas predominantes, se encontró que las categorías más comunes en todos los intervalos de evaluación fueron las de caldo, floral/frutal, leñoso y fresco (Tabla 24). La categoría de caldo se percibió como predominante en el día 1, mientras que el aroma de tipo floral/frutal se percibió como mayoritario en los días 30, 120 y 180. En cuanto al aroma fresco, este se percibió en los días 90, 150 y 180, para el leñoso sólo se percibió como dominante en el día 1. Estos hallazgos concuerdan con los descritos en mieles de Argentina, al presentar características aromáticas predominantes similares, incluyendo aroma floral, frutal y melaza/caldo (322,323). Además, es importante señalar que a lo largo del mundo, la familia de aromas florales, frutales y frescas, son las más apreciadas por los consumidores (324).

Las notas químicas, se percibieron en porcentajes de 7.69% en el día 120 y 3.85 en el día 1 y 90. Finalmente, la categoría de petroquímico no fue referida en ningún intervalo de valoración. Con respecto a la categoría aromática química, se ha manifestado que su identificación en muestras de miel, es atribuido a la incorporación de polen (325), siendo el posible origen de este descriptor en el alimento de diseño.

Se establece que el aroma de la miel depende de la concentración de diversos ácidos orgánicos y aminoácidos (326). Además, Kortensniemi et al. (327), establecieron que dentro de los elementos para la decisión de compra de los productos de miel, se encuentran la relación sabor/consistencia, influyendo en una proporción del 76 y 65%, respectivamente. Las variaciones de las subcategorías aromáticas predominantes en los diferentes intervalos de evaluación se presentan en la tabla 25. Las notas florales se encontraron en los días 30 y 90. La percepción de aromas resinoso (propóleo/resina de pino) se presentó en el día 1, 30 y 120, las notas frutales asociadas a la inclusión de polen, correspondieron a los días 60 y 120. En cuanto a la subcategoría fresco (relacionado a notas de menta, eucalipto, anís) fue predominante en los días 30, 60 y 150, a su vez el descriptor aromático cítrico se percibió en los días 60 y 180.

Finalmente, cabe destacar que el descriptor picante fue mayormente referido en el día 90 con una proporción de 11.54%, mientras que la subcategoría de medicina se percibió con mayor puntaje en el 120 (Tabla 25).



**Tabla 24.** Percepción de aromas predominantes por categoría.

Aroma predominante	Día 1		Día 30		Día 60		Día 90		Día 120		Día 150		Día 180	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Caldo	6	23.08	3	11.54	6	23.1	2	7.69	4	15.38	6	23.08	3	11.54
Floral/fruta fresca	5	19.23	8	30.77	6	23.1	7	26.92	7	26.92	7	26.92	7	26.92
Fresco	5	19.23	6	23.08	8	30.8	9	34.62	4	15.38	8	30.77	7	26.92
Leñoso	6	23.08	5	19.23	4	15.4	3	11.54	5	19.23	2	7.70	5	19.23
Vegetal	4	15.38	3	11.54	2	7.7	4	15.38	4	15.38	3	11.50	4	15.38
Químico	0	0.00	1	3.85	0	0.00	1	3.85	2	7.69	0	0.00	0	0
Total	26	100.00	0	100	0	100	26	100	0	100	0	100	26	100

**Tabla 25.** Percepción de aromas predominantes por categoría secundaria.

Categoría	Subcategoría	Día 1		Día 30		Día 60		Día 90		Día 120		Día 150		Día 180	
		Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Caldo	Quemado	1	3.85	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	3	11.54	1	3.85
	Fruta cocida	3	11.54	3	11.54	2	7.69	1	3.85	0	0.00	2	7.69	1	3.85
	Caramelizado	1	3.85	0	0.00	4	15.38	0	0.00	3	11.54	1	3.85	1	3.85
Floral/fruta fresca	Sutil	1	3.85	0	0.00	0	0.00	1	3.85	1	3.85	0	0.00	0	0.00
	Floral	2	7.69	4	15.38	2	7.69	5	19.23	3	11.54	4	15.38	4	15.38
Fresco	Frutal	3	11.54	3	11.54	4	15.38	2	7.69	4	15.38	3	11.54	3	11.54
	Fresco	2	7.69	4	15.40	4	15.38	3	11.54	3	11.54	7	26.92	2	7.69
	Cítrico	3	11.54	3	11.54	4	15.38	5	19.23	1	3.85	1	3.85	5	19.23
Leñoso	Seco	0	0.00	0	0.00	1	3.85	0	0.00	0	0.00	2	7.69	1	3.85
	Resinoso	4	15.38	4	15.38	2	7.69	1	3.85	4	15.38	0	0.00	4	15.38
Vegetal	Picante	2	7.69	1	3.85	1	3.85	3	11.54	1	3.85	0	0.00	0	0.00
	Fresco	3	11.54	1	3.80	0	0.00	3	11.54	2	7.69	1	3.85	0	0.00
Químico	Seco	1	3.85	2	7.69	2	7.69	2	7.69	2	7.69	2	7.69	4	15.38
	Medicina	0	0.00	1	3.85	0	0.00	0	0.00	2	7.69	0	0.00	0	0.00
Total		26	100	26	100	26	100	26	100	26	100	26	100	26	100

### **8.3. Contenido, capacidad antioxidante y quelante del alimento de diseño durante el almacenamiento.**

Los resultados del contenido de fenoles totales, ácido ascórbico, capacidad antioxidante y quelante del alimento de diseño durante el almacenamiento se muestran en la Tabla 26.

El contenido de fenoles totales se mantuvo constante durante el primer y segundo mes, con concentraciones en el intervalo de 173.56-185.83 mg EAG/100 g, se observa una disminución en los períodos evaluados (17%), entre el día 60 y 90 y se mantuvo relativamente constante hasta el término del almacenamiento con 157.29 mg EAG/100 g. Hubo una pérdida de 12.85% entre el día 1 y el 180. Esto se considera comparable a lo identificado por Zarei, et al. (265), en donde reportaron un mantenimiento del contenido hasta el tercer mes de almacenamiento de una miel multifloral, con una reducción de hasta 30% durante 12 meses. A su vez, los datos encontrados fueron semejantes a los de una mezcla de miel con 0.3% de propóleo (328) y mayores a los informados por Habryka et al. (329), en una miel enriquecida con 1% de extracto de propóleo ( $133.60 \pm 0.55$  mg EAG/100 g) (321) y por otros investigadores en mieles turcas. Este decremento de los compuestos fenólicos pudiera deberse a la degradación mediada por la oxidación e hidrólisis (330).

En el contenido de ácido ascórbico, se muestra una tendencia al decremento con 44.15 a 28.34 mg EAA/100 g, no encontrando diferencias significativas del día 1 hasta el 60, correspondiendo el valor más bajo al tercer mes. El almacenamiento tuvo un impacto significativo sobre esta característica, presentando reducción del 32.83% entre el inicio y final del almacenamiento. Uno de los factores que pudieran condicionar esta disminución, es la oxidación originada por el peróxido de hidrógeno por acción de la glucosa-oxidasa y catalasa (331).

Con respecto a la capacidad antioxidante, para el ensayo DPPH<sup>•+</sup> se apreció un comportamiento variable durante los intervalos de evaluación, encontrando cifras más altas en el día 30, 120 y 180 y los más bajos significativamente en el día 150 (1264.44  $\mu$ mol ET/100 g). Además, al contrastar el día 1 y el 180, se denota un incremento considerable de 2.19 veces al final del almacenamiento. De forma similar, Fauzi y Farid (332), encontraron

un aumento de hasta del 70%, en muestras de miel almacenadas durante un año. Kallithraka, Salacha y Tzourou (333), descubrieron un comportamiento similar, en muestras de vino blanco (almacenamiento 9 meses) y le atribuyeron este efecto a que los fenoles oxidados, pueden dar lugar a la formación de nuevos antioxidantes, entre ellos las quinonas, generadas a partir de polifenoles, mediante oxidación enzimática o autooxidación, implicadas en el pardeamiento, cambios en el aroma y deterioro nutricional en los alimentos, pero con importancia farmacéutica, al actuar como agentes quimiopreventivos (334).

Los valores presentados a excepción del día 150, fueron mayores a los indicados en muestras de miel enriquecida con 25% de polen de abeja (315). Similar efecto fue demostrado, en una miel con 10% de propóleo y jalea real, manifestando que conduce a un incremento de la capacidad antioxidante con valores de hasta 437  $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$  (335), sin embargo, fueron menores a los encontrados en este trabajo.

**Tabla 26.** Contenido y capacidad antioxidante del producto durante el almacenamiento (en 100 g de muestra).

Día	Fenoles (EAG)	Ascórbico (mg EAA)	DPPH <sup>+</sup> ( $\mu\text{mol ET}$ )	ABTS <sup>+</sup> (mg EAA)	FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{+2}$ )	% Actividad quelante
1	180.49±1.60 <sup>b</sup>	44.57±0.50 <sup>a</sup>	3643.33±0.00 <sup>b</sup>	60.67±1.73 <sup>b</sup>	18.75±0.15 <sup>g</sup>	44.10±0.77 <sup>abc</sup>
15	185.83±7.28 <sup>a</sup>	43.71±2.39 <sup>a</sup>	3773.33±186.60 <sup>b</sup>	56.23±4.40 <sup>b</sup>	19.86±0.30 <sup>f</sup>	41.87±2.95 <sup>bc</sup>
30	184.49±6.15 <sup>a,b</sup>	45.15±1.32 <sup>a</sup>	7486.66±351.10 <sup>a</sup>	53.83±1.31 <sup>b</sup>	21.15±0.09 <sup>e</sup>	43.21±1.17 <sup>bc</sup>
60	173.56±5.10 <sup>b</sup>	43.27±0.25 <sup>a</sup>	3271.11±110.90 <sup>b</sup>	57.92±1.60 <sup>b</sup>	21.47±0.01 <sup>e</sup>	45.85±1.20 <sup>ab</sup>
90	143.60±0.40 <sup>d</sup>	28.34±0.43 <sup>c</sup>	3371.11±41.94 <sup>b</sup>	77.47±3.73 <sup>a</sup>	28.76±0.33 <sup>a</sup>	42.36±1.53 <sup>bc</sup>
120	140.58±3.02 <sup>d</sup>	34.14±0.25 <sup>b</sup>	7531.11±19.24 <sup>a</sup>	82.09±3.06 <sup>a</sup>	25.99±0.59 <sup>c</sup>	40.54±3.38 <sup>c</sup>
150	145.65±2.57 <sup>cd</sup>	28.63±0.25 <sup>c</sup>	1264.44±203.60 <sup>c</sup>	76.76±3.31 <sup>a</sup>	26.96±0.18 <sup>b</sup>	41.74±0.13 <sup>bc</sup>
180	157.29±1.11 <sup>c</sup>	29.94±1.00 <sup>c</sup>	7986.66±260.30 <sup>a</sup>	81.83±0.47 <sup>a</sup>	25.10±0.20 <sup>d</sup>	40.87±0.99 <sup>c</sup>

<sup>a-g</sup> Indica diferencias significativas entre la misma muestra a diferentes días de almacenamiento ( $p < 0.05$ ).

La capacidad antioxidante determinada por el método de ABTS<sup>+</sup> presentó un incremento significativo a partir del tercer mes alcanzando el valor máximo en el cuarto mes (82.09 mg EAA/100 g). El aumento de la capacidad antioxidante al final del almacenamiento fue de 34.87%.

Por su parte, la capacidad antioxidante cuantificada por el método de FRAP reveló una tendencia cambiante al transcurrir el almacenamiento, correspondiendo las cifras más altas y bajas en el tercer mes y en el primer día, respectivamente. Los valores entre el inicio y final, se vio incremento de aproximadamente 33.86%. Estas cifras fueron menores a los

reportados por Juszczak et al. (336), en donde observaron una capacidad antioxidante de hasta 295.49.31  $\mu\text{mol Fe}^{+2}/100\text{ g}$ , en una mezcla de miel con 0.5 a 0.8% de jalea real y los obtenidos en una mezcla de miel con 25% de polen presentaban cifras de hasta 1328  $\mu\text{mol Fe}^{+2}/100\text{ g}$  (315). Estos datos difieren de los reportados en una miel multifloral almacenada 12 meses, en donde se encontró un decremento de hasta 55.01% (265).

En general, estas fluctuaciones en la capacidad antioxidante por los diversos métodos, se pueden deber a la generación de productos de la reacción de Maillard, los cuales pueden actuar como antioxidantes (337,338).

Por otro lado, los agentes quelantes de metales en los alimentos se consideran antioxidantes secundarios con capacidad para disminuir el potencial redox y por ende estabilizar los iones metálicos oxidados (339). Los valores encontrados estuvieron en el rango de 40.54 a 45.85%, correspondiendo la más alta y más baja al día 120 y 60, respectivamente, en donde al comparar los valores iniciales y finales, sólo hubo una reducción del 3.23% (Tabla 26).

#### **8.4. Bioaccesibilidad *in vitro***

La bioaccesibilidad de un alimento es definida como aquella fracción que ha sido liberada de la matriz alimentaria por la acción de enzimas mediante el proceso de la digestión y que está disponible para su absorción (340). Diversos compuestos sufren estas modificaciones y pueden tener comportamientos variables frente a diferentes ensayos de capacidad antioxidante (341).

Los compuestos fenólicos en los alimentos se encuentran principalmente como ésteres, glucósidos y polímeros, sin embargo, de esta forma no son absorbibles, por lo que requieren ser hidrolizados (342). Se estima que el 48% de estos se digieren en intestino delgado, 42% en intestino grueso y el 10% restante, se mantiene intacto en la matriz alimentaria, exceptuando las agliconas, ya que estas sí atraviesan las membranas biológicas (343). En la Tabla 27, se presenta el comparativo del contenido, capacidad antioxidante y actividad quelante de la muestra original (antes del proceso de digestión) y posterior al proceso digestivo *in vitro* (fracción bioaccesible) y el comportamiento de la bioaccesibilidad de estos compuestos y

capacidad antioxidante durante el almacenamiento.

Se presentó un aumento considerable en estos atributos (contenido de antioxidantes y capacidad antioxidante), en todos los ensayos a excepción del ácido ascórbico y DPPH<sup>•+</sup>, los cuales no se detectaron.

Previamente, se ha informado la baja bioaccesibilidad de la vitamina C en los modelos de digestión *in vitro* de mieles (344), debido a su inestabilidad y reactividad al oxígeno y pH alcalino después de la digestión (345). Con respecto a DPPH<sup>•+</sup>, la baja actividad, se ha atribuido a los diversos comportamientos de los compuestos antioxidantes presentes en los productos apiarios, sin embargo, la evidencia no profundiza específicamente sobre el tipo de elementos responsables de este efecto (346).

Para la muestra no digerida, los fenoles totales fueron de 180.49 para el día 1 y de 157.29 mg EAG/100 g, para el día final del almacenamiento. En la fracción bioaccesible incrementaron los CFT en una proporción de 7.69 veces en la muestra correspondiente al día 1 y 8.77 veces para el día 180, sin diferencias significativas entre los dos períodos de almacenamiento. Esto concuerda con lo reportado por Alevia et al. (347), los cuales identificaron un incremento después de la bioaccesibilidad, pero con concentraciones de alrededor de 200 mg EAG/100 g en muestras de miel.

Otro estudio, también describió un efecto semejante en una miel enriquecida con alga espirulina (*Spirulina platensis*), observando valores de 2263 mg EAG/100 g de contenido fenólico total (94). En polen, por el contrario, se ha descrito un perfil decreciente después de la fase intestinal, alcanzando un mínimo de 80 mg EAG/100 g (96). Con respecto al propóleo, Ozdal, et al. (100) identificaron hasta 55526.70 mg EAG/100 g en la fase intestinal de muestras originarias de Turquía, siendo mayor al obtenido en inicio y final del almacenamiento del alimento de diseño.

De forma semejante, la capacidad antioxidante por ABTS<sup>•+</sup> aumentó significativamente en el día 1 y 180 con 552.85 y 968.14 mg EAA/100 g (9.11 y 11.83 veces, respectivamente más, con respecto a la muestra original). En cuanto al ensayo de FRAP, arrojó cifras de 18.64 y 25.10  $\mu\text{mol Fe}^{+2}/100\text{ g}$ , para el inicio y final del almacenamiento,

respectivamente. Sin embargo, los datos exhiben un aumento en ambos, después de la bioaccesibilidad (63.45 y 42.58  $\mu\text{mol Fe}^{+2}/100 \text{ g}$ ), siendo 3.40 y 1.69 veces mayor, respectivamente.

O'Sullivan et al. (348) y Cianciosi et al. (349), observaron una disminución de la capacidad antioxidante en miel posterior a la digestión, no obstante, las cifras reportadas en estos estudios, fueron superiores (110 y 136.84  $\mu\text{mol Fe}^{+2}/100 \text{ g}$ , respectivamente). Comportamiento contrario fue identificado en propóleo turco, obteniendo una importante reducción de la capacidad antioxidante en la fase post digestión intestinal siendo hasta 59 veces menor con respecto a la muestra fresca (99). Finalmente, para la actividad quelante, se observó un incremento con respecto a la muestra original, de 19.99% (día 1) y 57.03% para el día 180.

**Tabla 27.** Bioaccesibilidad *in vitro* del alimento de diseño al inicio y final del almacenamiento.

Día	Fenoles totales (mg EAG/100 g)		ABTS <sup>•+</sup> (mg EAA/100 g)		FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{+2}/100 \text{ g}$ )	
	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después
1	180.49 $\pm$ 1.60 <sup>a</sup>	1387.62 $\pm$ 3.15 <sup>a*</sup>	60.67 $\pm$ 1.73 <sup>b</sup>	552.85 $\pm$ 12.07 <sup>b*</sup>	18.64 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	63.45 $\pm$ 0.52 <sup>a*</sup>
180	157.29 $\pm$ 1.11 <sup>b</sup>	1379.66 $\pm$ 17.76 <sup>a*</sup>	81.82 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	968.14 $\pm$ 10.77 <sup>a*</sup>	25.10 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	42.58 $\pm$ 0.85 <sup>b*</sup>

<sup>a-b</sup> Indica diferencias significativas entre el día 1 y 180, antes y después de la bioaccesibilidad ( $p < 0.05$ ). \*Indica diferencia entre el mismo día.



El mejoramiento de la capacidad antioxidante, posterior a la digestión intestinal pudiera ser debido a que los cambios del pH durante el proceso, mejoran la estabilidad de algunos polifenoles (350). Por ejemplo, el ácido cafeico, la quercetina, y el ácido clorogénico, son altamente estables a pH bajo (alrededor de 2, fase gástrica) (350,351). Por lo tanto, las condiciones de las diferentes fases de la digestión contribuyen a la liberación de los componentes, los cuales interaccionan con otros como las proteínas y minerales (352,353), resultando en un incremento de la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y de la capacidad antioxidante (354). No obstante, la presencia de azúcares reductores, pueden ocasionar sobrestimación del contenido fenólico total y la capacidad antioxidante (355,356), por lo que en el alimento de diseño, este componente estimado en 42% , pudo influenciar considerablemente.

### **8.5. Toxicidad oral aguda del producto (DL<sub>50</sub>)**

La evaluación de la toxicidad de un producto alimenticio, se considera necesario para efectos regulatorios para estimar los peligros potenciales de los productos químicos en los seres humanos, como guía en la selección de las dosis para estudios de toxicidad a largo plazo o como una pauta de seguridad para estudios que involucran el uso de animales (357).

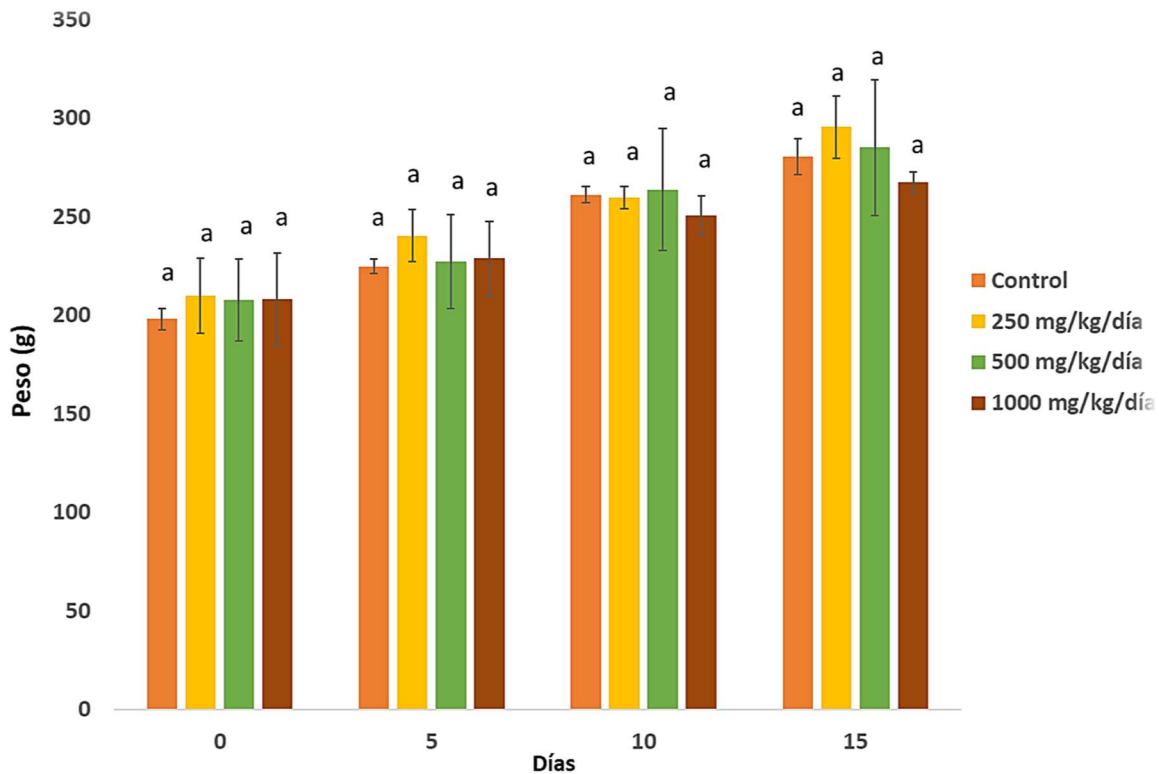
De acuerdo con lo observado mediante esta prueba, el alimento de diseño no ocasionó mortalidad, cambios en el comportamiento o alteraciones físicas en los animales de ningún grupo experimental. Estas observaciones fueron similares a las reportadas por Burdock (358), en muestras de propóleo, sugiriendo así que el producto es seguro para su consumo.

A continuación, se detallarán los hallazgos identificados en el peso y el análisis macroscópico de los órganos.

#### **8.5.1. Monitoreo del peso**

El registro de peso de los animales de experimentación durante la prueba sub-aguda del alimento de diseño se presenta en la Figura 16. En los niveles de dosis administrados (250, 500, 1000 mg/kg/día) del alimento de diseño, no manifestaron diferencias significativas sobre el peso. Después del período de observación, el menor peso se identificó en el grupo administrado con la mayor dosis, con  $267.5 \pm 5.25$  g, mientras que el mayor peso, en el grupo

administrado con 250 mg/kg (295.5±15.84 g). El peso al final del análisis (día 15) fue semejante entre los grupos, no obstante, la administración de 1000 mg/kg, pudo tener un efecto sobre el control del aumento de peso en los animales de experimentación, aun no siendo significativo.



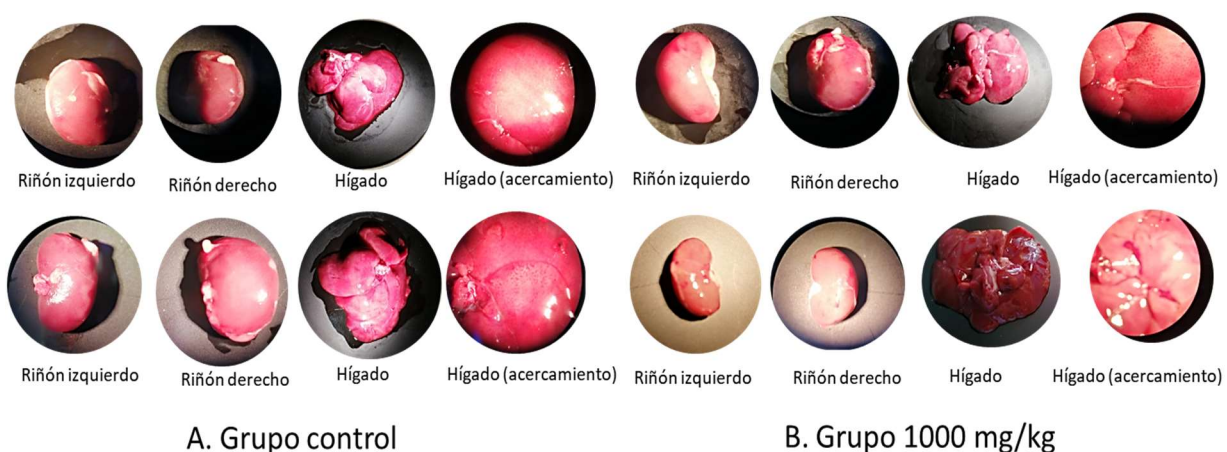
**Figura 16.** Monitoreo de peso durante la prueba de toxicidad en 3 niveles de dosis. <sup>a</sup> Indica diferencia significativa entre grupos ( $p>0.05$ ).

Un estudio reveló el efecto de la miel para el control del aumento de peso en ratas *Sprague-Dawley* alimentadas con una dieta alta en grasas, mostró un mejoramiento del metabolismo de los lípidos, evitó el aumento de peso y redujo significativamente el peso de los órganos (359). De forma semejante, se ha descrito que la administración de miel a dosis de 500, 750 o 1000 mg/kg, es un agente prometedor para la reducción del Índice de Masa Corporal (IMC), índice de adiposidad, peso relativo de los órganos de ratas y en el perfil de lípidos (360). Otra investigación manifiesta que el consumo de miel en dosis de 1g y 2 g/kg en ratas, es seguro y protege el aumento de peso, mejora los niveles de triglicéridos e induce un aumento del nivel de colesterol HDL (361). El consumo de miel en adultos con obesidad (70 g/día), comparado con sucrosa, también ha exhibido un efecto benéfico en la reducción

del IMC, al mismo tiempo que generó un decremento significativo de los triglicéridos y proteína C reactiva (362).

### 8.5.2. Análisis macroscópico de hígado y riñón

El presente trabajo reveló que la administración continua del producto no ocasiona efectos adversos por la exposición constante, al no observar cambios notables en la coloración, forma y disposición de los órganos (hígado, riñón derecho e izquierdo). La Figura 17, presenta a detalle la evidencia fotográfica del estado de los órganos del grupo control y el tratado con la dosis de 1000 mg/kg/día. En el grupo control se aprecia un estado normal de los órganos, color característico, sin evidencia ni ninguna alteración. De forma semejante con la con la dosis más alta (1000 mg/kg/día), se presenta morfología normal en hígado y riñón (derecho e izquierdo), presentando una coloración característica, sin presencia de tejido cicatrizado, manchas o abultamientos.



**Figura 17.** Comparativo morfológico de riñón e hígado de ratas Wistar control y tratadas con 1000 mg/kg/día del alimento de diseño.

Lo anterior concuerda con lo manifestado por Ponte et al. (363) en un extracto herbal con propóleo y miel, al no reportar alteraciones anatómicas en los órganos, ni muerte, siendo seguro hasta una dosis de 15 mL/kg. También, la valoración de la toxicidad aguda y crónica de una formulación de jalea real, propóleo y veneno de abeja, manifestó que la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) excedía los 5000 mg/kg, indicando que su consumo era seguro y confiable, puesto que además no se presentaron alteraciones histológicas en los animales (102). Hina Kausar y Ram More (101), establecieron que el consumo de jalea real es seguro hasta una dosis de

2000 mg/kg. Cabe mencionar que la jalea real en el producto representa el 2%, por lo que la proporción añadida al alimento de diseño no superó la dosis evaluada en el estudio mencionado previamente.

Por lo consiguiente, una vez que se estimó y estableció la seguridad del alimento de diseño se procedió a evaluar el efecto en la urolitiasis mediante un modelo animal en ratas Wistar.

## **8.6. Efecto antilitiásico del producto**

### **8.6.1. Análisis de peso, volumen urinario y pH de la orina de los grupos experimentales (pre y post inducción)**

La ingestión de etilenglicol (EG), es un precursor de oxalato que ocasiona lesión renal aguda desde las 24 hasta las 72 horas posteriores a su administración (364), resultando en hiperoxaluria, cristaluria, sobresaturación e inactivación de agentes preventivos de la formación de cálculos renales (365). El pH normal de la orina en humanos es aproximadamente 6 aunque puede fluctuar entre 4.5 hasta 8.3 (366). La evidencia sugiere que el pH urinario interviene en la formación de los cálculos renales, desde la cristalización, crecimiento y agregación (367,368). En condiciones patológicas, el valor de pH refleja los trastornos en el equilibrio ácido-base, de modo que valores por debajo de 4.5 es el resultado de procesos correctivos y de compensación de la acidosis metabólica, mientras que cifras de 8 o más son indicativos de acidosis tubular renal, alcalosis metabólica y respiratoria, así como la presencia de infecciones bacterianas del tracto urinario (369).

En la Tabla 28, se muestran los análisis de peso, volumen urinario y pH urinario de los grupos experimentales. El peso promedio de los animales de experimentación no se incrementó de forma significativa en la fase pre-tratamiento ya que estuvo en el rango de 254.67 y 278.67 g y en la fase post de 354.46 a 367.46 g, sin diferencias significativas en ambos períodos, ello indicaría que la ingesta regular del producto no impactó en este parámetro en ninguna fase del análisis.

Además, los productos apiaris pueden tener efectos benéficos para el control del peso. La miel consumida durante 4 semanas (1 o 2 g/kg), en ratas ha exhibido efecto protector

sobre la ganancia de peso en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas (370). En un estudio clínico aleatorizado de pacientes con diabetes, demostró que al consumirse en dosis de 1000 mg/día, durante 8 semanas, presentaron una disminución significativa del peso (371). En otro estudio se encontró que el propóleo (extracto, 50 mg/kg), después de ser administrado durante 30 días, se estableció como coadyuvante en el tratamiento de la obesidad, al impactar favorablemente en el peso de ratones (372). El volumen urinario basal fue homogéneo en los grupos, sin diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la fase pre, encontrándose en el intervalo de 13.4-18 mL/día y 13.2 y 20.83 mL/día en la post inducción, identificando las cifras más altas en los grupos EG y EG+AD. Este rango, fue similar al reportado en un estudio que analizó el efecto antilitiásico del ácido ferúlico (administración de 40 y 80 mg/kg), al describir un volumen entre 10.64 a 18.21 mg/dL (373).

**Tabla 28.** Peso y características urinarias (pH y volumen) de los grupos experimentales.

Grupo	Peso (g)		Volumen urinario (mL)		pH	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	269.41±10.07 <sup>a</sup>	354.46±12.93 <sup>a*</sup>	13.40±3.20 <sup>a</sup>	13.20±2.71 <sup>b</sup>	7.85±0.28 <sup>a</sup>	8.51±0.50 <sup>a*</sup>
EG	278.67±7.25 <sup>a</sup>	359.57±11.68 <sup>a*</sup>	18.00±2.09 <sup>a</sup>	21.33±7.68 <sup>a</sup>	7.92±0.30 <sup>a</sup>	8.13±0.45 <sup>a,b</sup>
AD	273.83±17.20 <sup>a</sup>	359.20±19.30 <sup>a*</sup>	14.16±4.91 <sup>a</sup>	15.00±3.74 <sup>a,b</sup>	7.76±0.23 <sup>a</sup>	7.76±0.38 <sup>a</sup>
AD+EG	254.67±17.94 <sup>a</sup>	359.36±25.44 <sup>a*</sup>	16.60±3.77 <sup>a</sup>	20.83±2.22 <sup>a</sup>	7.73±0.21 <sup>a</sup>	7.35±0.53 <sup>c</sup>
EG+AD	267.67±20.06 <sup>a</sup>	367.46±22.36 <sup>a*</sup>	15.00±1.78 <sup>a</sup>	18.83±1.72 <sup>a,b*</sup>	7.76±0.40 <sup>a</sup>	7.34±0.21 <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup> Letras superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales. \* Indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el mismo grupo antes (Pre) y después de la administración (Post). Control= *ad libitum*; EG= etilenglicol al 0.75%; AD=alimento de diseño; AD+EG= alimento de diseño y etilenglicol (preventivo); EG+AD= etilenglicol y transcurridos 14 días, administración del alimento de diseño (correctivo/terapéutico).

Para el pH basal (pre), no se observaron diferencias estadísticamente significativas, en cambio, en la fase post, se identificaron valores más altos en los grupos control, EG y AD. Se encontró un comportamiento similar por el consumo de una formulación herbal denominada “lithocare®”, al reportar un pH urinario mayor en el grupo de EG (9.48) contra 7.14 de la formulación herbal (374).

Los resultados del presente estudio concuerdan con Abhirama y Shanmuga Sundaram (375), informando cifras de pH en el intervalo de 6.80 a 8.2, correspondiendo las más altas al grupo tratado con etilenglicol y las más bajas aquel tratado con un extracto de *Biophytum sensitivum*, una planta originaria de la India.

Por otra parte, de acuerdo a Elghouizi et al. (376), el polen de abeja es un producto apícola eficaz para reducir la proteinuria, como ahorrador de potasio y por lo tanto pudiera tener efecto en la elevación del pH urinario durante la litiasis, ello puede estar explicando parte del efecto encontrado en este indicador en el presente estudio.

### 8.6.2. Evaluación clínica urinaria (prueba rápida) de los grupos experimentales durante la administración

En la Tabla 29, se puede observar que la cifra más baja corresponde a AD y AD+EG. Esto indica que estos grupos, presentaron menor excreción de componentes urinarios (cristales de oxalato, ácido úrico, creatinina, etcétera), ya que la alta densidad urinaria es un indicativo de la cantidad de componentes urinarios solubilizados y es inversamente proporcional al volumen urinario (359).

**Tabla 29.** Test urinario general de los grupos experimentales

Grupo	Densidad	mg/dL					Leucocitos cel/ $\mu$ L
		Urobilinógeno	Sangre	Cetonas	Proteína		
Control	1.015	0.20	---	15.00	30.00	15.00	
EG	1.015	0.20	---	15.00	30.00	15.00	
AD	1.010	0.20	---	---	15.00	---	
AD+EG	1.010	0.20	---	---	---	---	
EG+AD	1.015	0.20	0.15	15.00	30.00	---	

Control= *ad libitum*; EG= etilenglicol al 0.75%; AD=alimento de diseño; AD+EG= alimento de diseño y etilenglicol (preventivo); EG+AD= etilenglicol y transcurridos 14 días, administración del alimento de diseño (correctivo/terapéutico).

El urobilinógeno es un componente que se origina por la conversión de la bilirrubina en los intestinos, mediada por enzimas bacterianas, una pequeña parte se excreta en la orina (377). Los datos observados evidenciaron cifras de normalidad, por lo que se deduce, lo que indicaría correcta metabolización del mismo en los animales (entre 0.1 a 1 mg/dL) (378).

En cuanto a la hematuria, se identificó la presencia de trazas en el grupo EG+AD (grupo 5). Esto puede deberse a los efectos tóxicos del etilenglicol y a su capacidad para irritar la mucosa gástrica, ocasionando hemorragias focales (379). Con respecto a la proteinuria, éste se identificó en 30 mg/dL en todos los grupos experimentales excepto en el grupo AD, este dato puede sugerir una disminución de la función renal (380). No obstante,

este parámetro por sí solo no es concluyente, pero sí cuando se encuentran otros elementos como hematuria, tal como se aprecia en EG+AD.

Finalmente, para el resto de los parámetros urinarios evaluados mediante este proceso, no se identificó bilirrubina, ni glucosa en ninguno de los grupos experimentales.

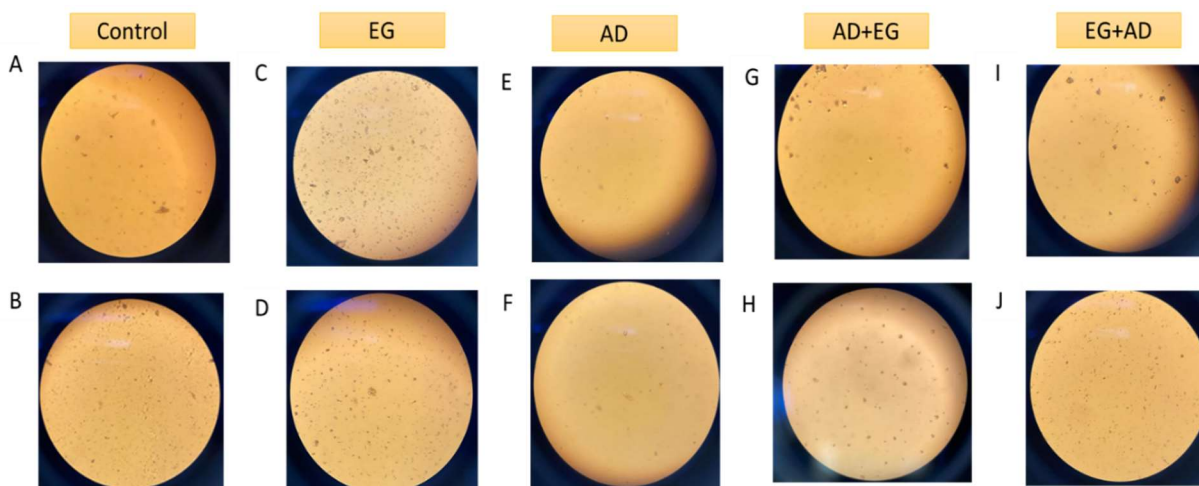
### **8.6.3. Examen microscópico del sedimento urinario**

El análisis macroscópico de la orina es un proceso relevante en la nefrología para obtener información detallada de los elementos presentes en ella, tanto para el diagnóstico como para el esclarecimiento de alteraciones renales junto con la exploración física, pruebas de suero y urinarias (381).

Los modelos animales de inducción de cálculos comparados a los humanos se consideran análogos en cuanto a estructura y composición, por tanto, los modelos disponibles son una herramienta experimental para describir la fisiopatología. La administración de etilenglicol en animales de experimentación, es uno de los más utilizados en la investigación para inducir litiasis, por el daño a las células epiteliales de las nefronas, con la posterior nucleación, agregación de los cristales y necrosis celular (115,373).

La Figura 19, representa el análisis microscópico del sedimento urinario, en los diferentes grupos experimentales. En el grupo control, se observan pequeñas estructuras definidas como filamentos proteicos, que no son agrupamiento de cristales. Se observó una alta concentración de microcristales en EG, comprobando así la instauración del daño, mientras que el tratamiento combinado con la inducción de litiasis (AD+EG y EG+ AD), presentaron menor presencia de ellos, especialmente en el grupo AD+EG.

La menor cristaluria en los grupos tratados (AD+EG y EG+AD), puede deberse a que la inhibición de la fase de agregación de los cálculos, facilita su excreción y dilución, generando al mismo tiempo menor probabilidad de encontrarlos en el tejido renal (382).



**Figura 18.** Análisis microscópico del sedimento urinario de los grupos experimentales en diferentes campos. A y B: grupo control, sin presencia de cristales. C y D: EG, severa presencia de cristales. E y F: Alimento de diseño, sin signos aparentes de cristales. G y H: AD+EG. I y J: EG+AD.

Estos hallazgos fueron semejantes a los descritos por Sharma et al. (111), en un extracto de *Bergenia ligulata* (planta floral originaria del Himalaya), al encontrar que los grupos tratados presentaron cristales más pequeños, casi disueltos y en menor cantidad, También estuvieron en concordancia con los reportados en un extracto del tallo del árbol de plátano, al describir un comportamiento semejante asociado al número y tamaño de los cristales (383). Por último, la administración de propóleo en extracto (100 mg/kg), durante 30 días, también manifestó el mismo efecto (123).

Cabe destacar, que el análisis del sedimento urinario requiere complementarse con la evaluación urinaria, para analizar íntegramente los mecanismos implicados en la litiasis renal, los cuales se detallarán a continuación.

#### 8.6.4. Evaluación urinaria

Las terapias integrales y correctivas actuales proporcionan beneficios a quien padece de urolitiasis, sin embargo la generación de nuevas líneas de conocimiento, debe proveer enfoques profilácticos con menos recidiva, eficaces para proveer un efecto inhibitorio para la formación de nuevos cálculos renales (14).

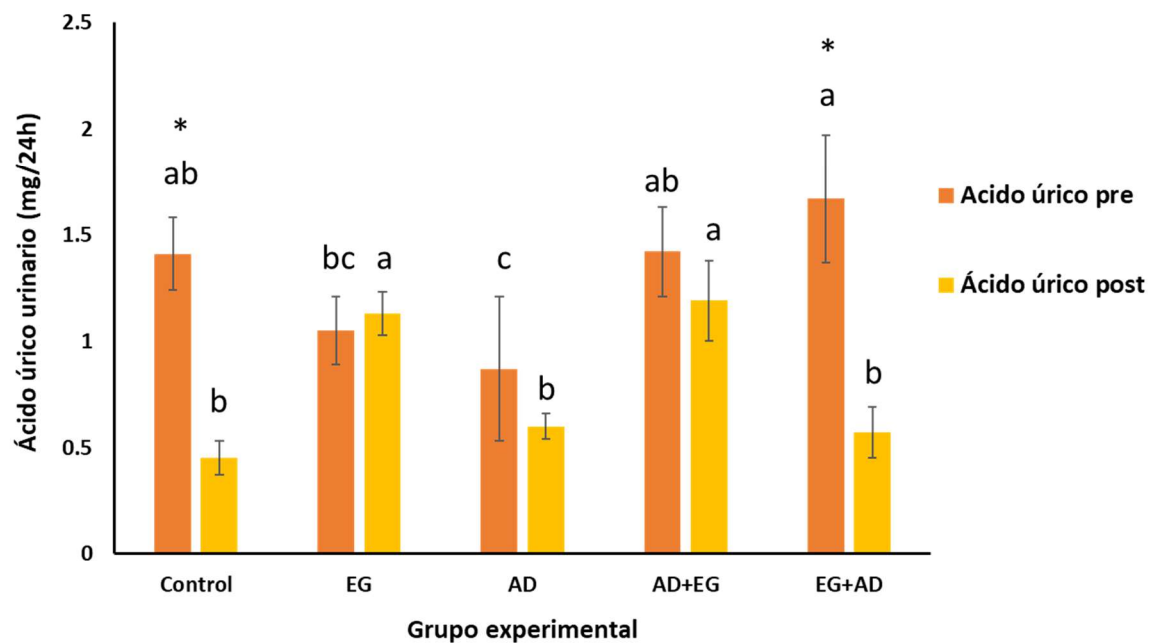
El ácido úrico, es un componente que modifica la solubilidad del oxalato de calcio, de modo que cuando se encuentra elevado beneficia la nucleación y reduce la actividad



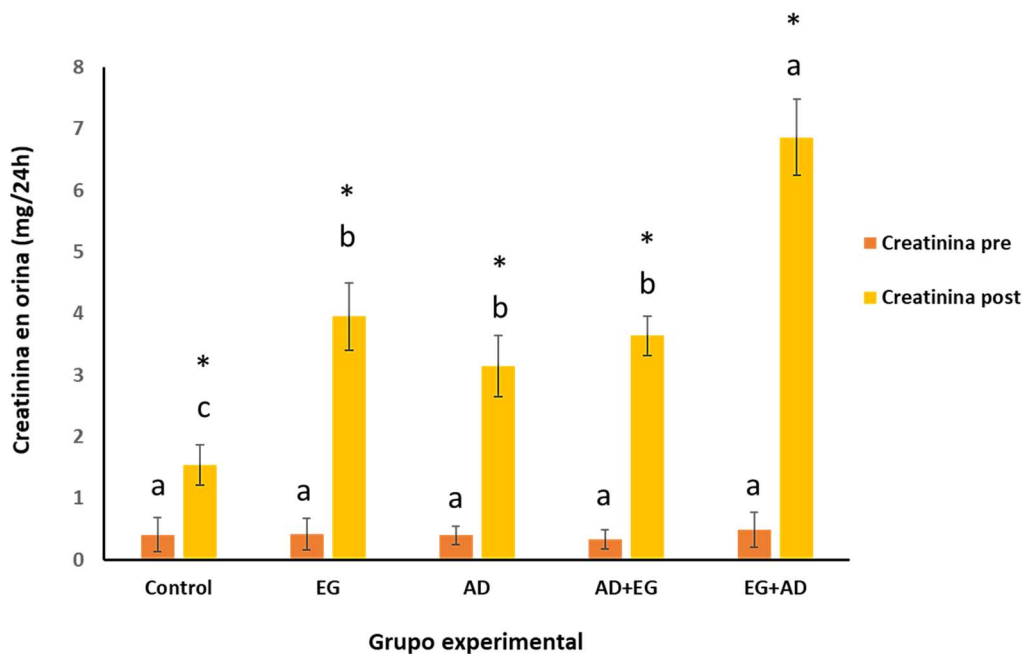
inhibitoria de los glucosaminoglucanos (384). Se observa en la Figura 19, que los valores pre-experimentales fueron mayores a los post a excepción del grupo EG, en el que se denota un aumento de la excreción debido a la inducción de la litiasis, mientras que la administración del alimento de diseño, ocasionó un decremento significativo ( $p<0.05$ ) en estos dos períodos, especialmente en EG+AD, lo que indica que el consumo del alimento de diseño pudo reducir la excreción de ácido úrico.

La administración de un extracto de *Macrotyloma uniflorum*, conocido comúnmente como frijol verde, originario de Asia en dosis de 400 y 800 mg/kg presenta un efecto semejante al ocasionar un decremento significativo de los valores de ácido úrico en orina, al mismo tiempo que mejora de los cambios inducidos en el riñón (116). Por otro lado, el polen (500 mg/kg), en un modelo de ratas, también ha evidenciado ser eficaz para reducir la excreción de ácido úrico hasta en un 29% (376). Esto puede ser debido al efecto inhibitorio del polen sobre la enzima xantina oxidasa (385). La xantina oxidasa, es una enzima implicada en el metabolismo de las purinas, que cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y luego a ácido úrico (375). En la práctica clínica, el alopurinol es el único inhibidor empleado para disminuir la hiperuricemia, sin embargo, presenta diversos efectos adversos (376). Por tanto, los resultados infieren que el alimento de diseño, al contener polen, pudiera ser una alternativa coadyuvante para controlar la excreción de ácido úrico en la litiasis.

La creatinina por su parte, es un parámetro que se emplea para verificar que la recolección de orina fue adecuada (386). En la fase pre-inducción este indicador no presentó diferencias estadísticas, mientras que en la fase post, el contenido fue más bajo en el grupo control, con 1.54 mg/24h y los más altos correspondieron a EG+AD, con 6.86 mg/24 (Figura 20). Estos resultados estuvieron en concordancia con Tabas et al. (387), al identificar un aumento significativo en los niveles de creatinina mediante la inducción de litiasis con EG (1.08 mg/dL) y una disminución significativa de este indicador (hasta de 0.76 mg/dL), al administrar 300 mg/kg de un extracto de *palma datillera* (palmera).

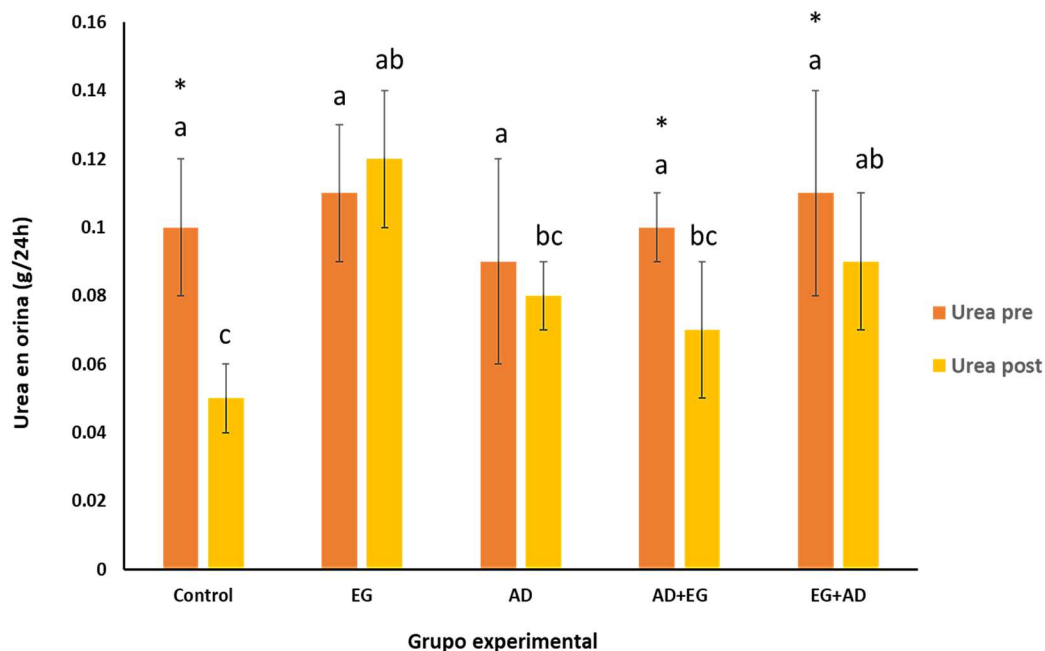


**Figura 19.** Ácido úrico en orina pre y post de los grupos experimentales. <sup>a-c</sup> Letras superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales. \*Indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el mismo grupo antes (pre) y después de la administración (post). Control= *ad libitum*; EG= etilenglicol al 0.75%; AD=alimento de diseño; AD+EG= alimento de diseño y etilenglicol (preventivo); EG+AD= etilenglicol y transcurridos 14 días, administración del alimento de diseño (correctivo/terapéutico).



**Figura 20.** Creatinina urinaria pre y post de los grupos experimentales. <sup>a-c</sup> Letras superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales. \*Indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el mismo grupo antes (pre) y después de la administración (post). Control= ad libitum; EG= etilenglicol al 0.75%; AD=alimento de diseño; AD+EG= alimento de diseño y etilenglicol (preventivo); EG+AD= etilenglicol y transcurridos 14 días, administración del alimento de diseño (correctivo/terapéutico).

La urea en orina se considera el principal producto del metabolismo de las proteínas, su excreción está determinada por la reabsorción renal y la filtración glomerular, en conjunto con los demás indicadores, ejerce un papel clave en la saturación de la orina (388). En la fase pre, la urea se cuantificó en intervalos de 0.09 a 0.11 g/24 h (Figura 21), sin diferencias entre grupos, mientras que transcurrido el tiempo de intervención la administración del AD protegió contra la elevación de la urea a nivel urinario en AD+EG, exhibiendo valores similares al grupo control. En cambio, los más altos corresponden al grupo EG, con cifras promedio de 0.12 g/24 h.



**Figura 21.** Urea en orina pre y post de los grupos experimentales. <sup>a-c</sup> Letras superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales. \*Indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el mismo grupo antes (pre) y después de la administración (post). Control= ad libitum; EG= etilenglicol al 0.75%; AD=alimento de diseño; AD+EG= alimento de diseño y etilenglicol (preventivo); EG+AD= etilenglicol y transcurridos 14 días, administración del alimento de diseño (correctivo/terapéutico).

En general, se deduce que la excesiva acumulación de promotores urinarios de cálculos renales (elevación de urea, creatinina y ácido úrico), origina efectos tóxicos en las células epiteliales renales, alterando la integridad de la membrana y generando sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y agotamiento de las enzimas antioxidantes (389).

Esta desregulación conduce a la producción de varios moduladores de cristalización (390), y estimula la producción de moléculas proinflamatorias a nivel celular y alteraciones osteogénicas (391). Por tanto, la profilaxis enfocada al mejoramiento de los indicadores urinarios, sustentan que los antioxidantes en los alimentos muestran alta capacidad para reducir los efectos renales perjudiciales y la hiperoxaluria (392), hecho que puede justificar el efecto observado en el presente estudio, debido a la diversidad de compuestos antioxidantes que conforman el alimento de diseño, a partir de la mezcla con sus diferentes

productos apiarios, ocasionando protección contra la elevación de los niveles de urea y ácido úrico en el grupo preventivo (AD+EG) y correctivo (EG+AD)

#### **8.6.5. Análisis bioquímico sérico**

La evaluación sérica (glucosa, proteínas, ácido úrico, urea y creatinina), se presenta en la Tabla 30, señalizando las diferencias en las fases pre y post inducción de litiasis. En el presente estudio, se evaluaron los niveles de glucosa para establecer si estos no se veían alterados con la inducción de la litiasis y/o el consumo continuo del AD.

La concentración de glucosa no presentó diferencias en la fase pre, sin embargo, en la fase post se incrementaron, a excepción del grupo control, fluctuando en el rango de 73.89 a 90.35 mg/dL. Previamente, un estudio describió cifras similares de glicemia en el grupo control y además manifestó que la administración de miel (1, 2 y 3 g/kg), durante 3 semanas en ratas con diabetes inducida, mejora los niveles de glucosa (presentando concentraciones 35% menores, comparado con el grupo con diabetes (393)).

El estudio de las proteínas séricas totales, toman relevancia debido a que algunas proteínas como la albúmina y globulina, tienen afinidad al calcio frente a la administración o ingestión de etilenglicol, favoreciendo la nucleación del CaOx (394), de modo que un valor incrementado por arriba de lo reportado en ratas sin litiasis, pudiera indicar mayor predisposición a la presencia de cálculos renales. Sin embargo, de acuerdo con lo presentado en la Tabla 30, todos los grupos los menores valores correspondieron a la fase post, a excepción del grupo EG+AD ( $6.26 \pm 0.77$  g/dL). No obstante, estos fueron similares a los reportados por Asuk et al. (395), en ratas Wistar sin litiasis, los cuales manifestaron una concentración en el intervalo de 6.50-6.79 g/dL, por lo que datos obtenidos en este grupo, no se consideran anormales aun cuando fueron más altos.

**Tabla 30.** Evaluación bioquímica de los grupos experimentales

Grupo	Glucosa		Proteínas totales		Ácido úrico		Urea		Creatinina	
	mg/dL		g/dL		mg/dL		mg/dL		mg/dL	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	71.33±6.50 <sup>a</sup>	73.89±6.11 <sup>b</sup>	6.65±0.31 <sup>ab*</sup>	4.82±0.46 <sup>b</sup>	11.97±0.27 <sup>ab</sup>	14.64±0.87 <sup>ab*</sup>	52.99±3.72 <sup>b</sup>	58.44±9.92 <sup>a</sup>	0.85±0.06 <sup>a</sup>	0.60±0.10 <sup>a*</sup>
EG	63.31±0.98 <sup>a</sup>	87.58±5.63 <sup>a*</sup>	6.11±0.35 <sup>ab*</sup>	4.66±0.51 <sup>b</sup>	13.07±0.50 <sup>a</sup>	15.59±0.47 <sup>a*</sup>	37.03±0.88 <sup>c</sup>	51.70±6.63 <sup>a*</sup>	0.70±0.10 <sup>a</sup>	0.67±0.10 <sup>a</sup>
AD	66.43±3.46 <sup>a</sup>	82.85±5.54 <sup>a*</sup>	6.19±0.54 <sup>ab*</sup>	5.18±0.26 <sup>b</sup>	12.16±1.17 <sup>ab</sup>	13.17±1.63 <sup>b</sup>	52.06±5.17 <sup>b*</sup>	32.60±2.77 <sup>b</sup>	0.77±0.14 <sup>a</sup>	0.65±0.14 <sup>a</sup>
AD+EG	62.82±0.81 <sup>a</sup>	88.96±2.19 <sup>a*</sup>	7.03±0.62 <sup>a*</sup>	4.77±0.18 <sup>b</sup>	10.06±0.65 <sup>b</sup>	11.12±0.45 <sup>c</sup>	34.47±0.98 <sup>c</sup>	26.56±7.61 <sup>b</sup>	0.84±0.07 <sup>a</sup>	0.70±0.09 <sup>a*</sup>
EG+AD	67.15±0.90 <sup>a</sup>	90.35±3.30 <sup>a*</sup>	5.63±0.46 <sup>b</sup>	6.26±0.77 <sup>a</sup>	11.31±1.04 <sup>ab*</sup>	4.46±0.24 <sup>d</sup>	70.72±6.11 <sup>a*</sup>	37.12±4.55 <sup>b</sup>	0.65±0.02 <sup>a</sup>	0.66±0.16 <sup>a</sup>

<sup>a-c</sup> Letras superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales. \*Indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el mismo grupo antes (pre) y después de la administración (post). Control= ad libitum; EG= etilenglicol al 0.75%; AD=alimento de diseño; AD+EG= alimento de diseño y etilenglicol (preventivo); EG+AD= etilenglicol y transcurridos 14 días, administración del alimento de diseño (correctivo/terapéutico).

Por otra parte, se sugiere que la administración del alimento de diseño, protegió contra la elevación de los niveles de ácido úrico en la fase experimental (post) con 4.46 mg/dL en el grupo EG+AD vs 15.59 mg/dL del grupo EG. De forma semejante, se ha informado que la administración de propóleo en dosis de 250, 350 y 500 mg/kg en un modelo de litiasis en ratas, previene el incremento de los niveles de ácido úrico, al mismo tiempo que mejora las enzimas hepáticas y densidad urinaria (396).

Con respecto a los niveles de urea, se identificaron diferencias en los grupos experimentales en la fase post, observando que el alimento de diseño redujo significativamente los valores comparados con el control. El grupo EG+AD, presentó la concentración más baja con 26.56 mg/dL. Esta cifra, fue menor a la descrita por la administración de cystone (5 mL/kg) y de un extracto herbáceo de *Pascopyrum smithii* durante 10 días, en ratas Wistar, al reportar 41.99 y 39.28 mg/dL, respectivamente (397).

Por último, en la creatinina, no hubo diferencias entre los grupos experimentales en la fase pre y post. Esto difiere de lo reportado por Mahmud et al. (398), el cual concluyó que la administración de un extracto de *Allium siculum*, (planta herbácea, conocida como ajo de miel), disminuye los niveles de creatinina en un modelo de litiasis en ratas Wistar.

Es sabido que gran parte de los efectos terapéuticos o coadyuvantes de los productos naturales se debe a la presencia de fitoquímicos, con dianas muy específicas de carácter celular que ejercen un efecto sinérgico con otros componentes de las matrices alimentarias, potenciando la acción de los compuestos bioactivos (399). No obstante, aun cuando no se conoce en su totalidad el mecanismo de acción de estos compuestos, una gama moderadamente amplia demuestra, impedir la cristalización del oxalato de calcio, debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y diuréticas (400). Entre ellos el ácido cafeico (217), catequina (401), quercetina (214) y diosmina (402).

#### **8.6.6. Análisis histológico**

El análisis se llevó a cabo con la finalidad de evaluar la presencia de depósitos de oxalato de calcio, mediante la observación de la birrefringencia con luz polarizada y los cambios ocasionados debido a la inducción de la litiasis, a través de la tinción con

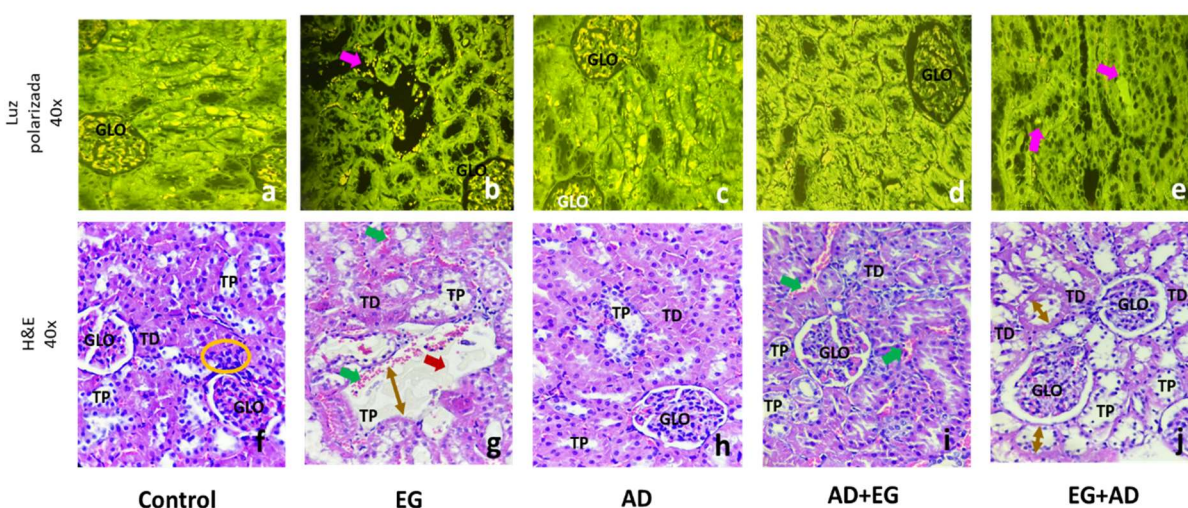
hematoxilina y eosina (H&E). En las Figura 22 a-e, se muestran las imágenes obtenidas con luz polarizada, para todos los grupos experimentales a 40x. observando material con birrefringente de origen mineral en EG y EG+AD (Figura 22 b y e).

En cuanto a la tinción con hematoxilina y eosina, los principales hallazgos se exhiben en la Figura 22 f-j. El grupo control, manifestó una arquitectura normal, sin indicios de litiasis, infiltrado eritroleucocitario o necrosis (Figura 22-f). El etilenglicol, como inductor de urolitiasis, ocasionó deposición de cristales en los túbulos distales, dilatación tubular distal, datos sugerentes de pérdida de funcionalidad (asociado a un decremento en el número de nefronas), alteración en la morfología, así como importante infiltrado eritroleucocitario (dato sugerente de inflamación aguda) (Figura 22-g). El grupo AD, por su parte, no presentó anomalías glomerulares y tubulares, ni signos de litiasis (Figura 22-h). El grupo AD+EG, evidenció disminución de la dilatación tubular, decremento de los cálculos renales y de las lesiones asociadas a la litiasis y mejor funcionalidad, asociada a mayor presencia de nefronas (Figura 22-i). Finalmente, en el grupo EG+AD, se observó que el tratamiento con el alimento de diseño, corrigió moderadamente el daño tisular en las estructuras renales, al mismo tiempo que mejoró los signos aparentes de inflamación (Figura 22-j).

De forma semejante, Sharma et al. (111), establecieron que un extracto de *Bergenia ligulata* (185 mg/kg, durante 4 semanas), presentaba una reducción de los efectos tóxicos del etilenglicol en la histología, a través del mejoramiento de la dilatación tubular renal y la infiltración de células inflamatorias. Otro extracto de que ha sido reconocido por sus efectos antilitiásicos, es el de la palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.), en dosis de 300 mg/kg, durante 3 semanas, tiene actividad en la reducción del número y tamaño de los depósitos de oxalato en los túbulos renales (387). También, la administración en dosis de 500 mg/kg de un extracto de menta negra (*Mentha piperita*), en ratas Wistar, al exhibir un mejoramiento de la membrana renal y la lesión epitelial inducida por los cristales de oxalato (403), ocasionando efectos similares a los descritos en el presente estudio.



Existe escasa evidencia del efecto de productos de la colmena en modelos de litiasis, no obstante, Elghouzi et al. (376), describe los efectos del polen, indicando que su consumo a dosis de 500 mg/kg en ratas impide considerablemente la inflamación, necrosis, dilatación y congestión tisular, a la misma intensidad incluso que la cystone (una formulación herbal reconocida ampliamente para tratar la urolitiasis). Otro estudio sustenta que el propóleo en extracto a dosis de 250 mg/kg es seguro y efectivo para contrarrestar los efectos tóxicos del etilenglicol, al mismo tiempo que presenta un efecto diurético mayor comparado con la furosemida en ratas Wistar (396).



**Figura 22.** Análisis histopatológico renal de los grupos experimentales. Control= *ad libitum*; EG= etilenglicol al 0.75%; AD=alimento de diseño; AD+EG= alimento de diseño y etilenglicol (preventivo); EG+AD= etilenglicol y transcurridos 14 días, administración del alimento de diseño (correctivo/terapéutico); GLO= glomérulo; TD= túbulo renal distal; TP= túbulo renal proximal; ↑ = sugiere birrefringencia con luz polarizada de depósitos minerales; ↑ = indica presencia de microcristales en tinción con H&E; ↑ = indica infiltración eritroleucocitaria; ○ señala nefronas; ↕ señala dilatación tubular distal

Mediante lo encontrado a través del análisis histológico, se pudo construir una escala semi-cuantitativa de las lesiones renales observadas (Tabla 31). La degeneración renal, se observó con mayor intensidad en el grupo EG, categorizándola como lesiones difusas, lo que puede sugerir pérdida de la funcionalidad renal, en respuesta la toxicidad que ocasiona el etilenglicol. Con respecto a la necrosis, se identificó que la ingestión del alimento de diseño en AD, mejora las lesiones causadas por la litiasis cambiando de “severas a leves”. Por otro lado, la inflamación se encontró en todos los grupos experimentales, siendo más evidente en

el grupo EG, en su categoría severa, misma que fue revertida en el grupo EG+AD, obteniendo el mismo puntaje que el control. Para la urolitiasis, la administración del alimento de diseño revirtió la formación de cristales de oxalato en EG+AD, ya que no se apreciaron depósitos francos. Sin embargo, en el grupo AD+EG se vio disminuida, cambiando de moderada a leve después del período de intervención.

En relación a la fibrosis, no se previno en el grupo AD+EG, pero si se corrigió en el grupo EG+ED, lo que indica que el alimento de diseño, puede ser un agente prometedor para contrarrestar el efecto fibrótico de la hiperoxaluria como correctivo. Finalmente, la dilatación tubular proximal, se presentó en ambos grupos de tratamiento (AD+EG y EG+AD), indicando que ello surgió como mecanismo compensatorio de la ingestión del etilenglicol y de la litiasis en sí.

**Tabla 31.** Evaluación semi-cuantitativa de las lesiones renales asociadas a litiasis

Grupo	Degeneración Renal	Necrosis Renal	Inflamación	Urolitiasis	Fibrosis	Dilatación tubular proximal
Control	-	-	+	-	-	-
EG	++++	+++	+++	++	++	-
AD	-	-	+	-	-	-
AD+EG	++	+	++	+	++	++
EG+AD	++	+	+	-	+	++

(-) lesiones no detectables; (+) lesiones leves; (++) lesiones moderadas; (+++) lesiones focales severas; (++++); lesiones difusas severas. Control= *ad libitum* (grupo 1); EG= etilenglicol al 0.75% (grupo 2); AD=alimento de diseño (grupo 3), AD+EG= alimento de diseño y etilenglicol (grupo 4; preventivo); EG+AD= etilenglicol y transcurridos 14 días, administración del alimento de diseño (grupo 5 correctivo/terapéutico).

Parte de los efectos observados en el presente estudio, se justifican porque algunos compuestos bioactivos (flavonoides, ácidos fenólicos y saponinas) modulan la sobreproducción de cristales de oxalato, previenen la nucleación y agregación y por lo consiguiente limitan la formación de “litos” y las modificaciones tisulares (404,405).

Estos hallazgos concuerdan con los reportados por El-Ashmawy et al. (406), en donde se describen los efectos antilitiásicos de cystone y de candesartán como agentes protectores de la inflamación, degeneración renal y fibrosis.

El efecto protector y coadyuvante del alimento de diseño se sustentaría con algunos reportes enfocados en esclarecer los posibles mecanismos de acción. Uno de ellos es el efecto

diurético que pueden ejercer los flavonoides, mismos que mejoran la fibrosis y la inflamación (407,408). Los alcaloides, también se han descrito como posibles coadyuvantes en el control y tratamiento de la litiasis (409). Por su lado, la capacidad de algunos fitoquímicos, para formar quelatos con hierro y cobre, conduce a una disminución de la peroxidación lipídica, la cual juega un papel importante en la producción de ROS (410) y por ende modulan la inflamación causada por litiasis, entre ellos el ácido gálico (411), ácido protocatecuico (412), cafeico, clorogénico y ferúlico (410). Otro factor implicado en la prevención de los depósitos de oxalato, es la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina, proceso por el que se regula la producción de radicales libres, desempeñando al mismo tiempo función preventiva contra el daño tisular y la inflamación renal, algunos de estos efectos los presentan el ácido cafeico, ácido clorogénico, quercetina (413), apigenina, kaempferol y luteolina (414). Por último, se ha establecido que el kaempferol y el ácido vanílico, presentan potencial preventivo de la sobreproducción de las moléculas proinflamatorias, mediante la inhibición de vías del óxido nítrico, activación de NF- $\kappa$ B (415,416).

## 9. CONCLUSIONES

\*El alimento de diseño a partir de productos apiarios proporciona propiedades fisicoquímicas relevantes, permaneciendo su estabilidad, con nivel de agrado aceptable, elevada bioaccesibilidad de antioxidantes y con efecto preventivo y coadyuvante en la litiasis renal.

\*Los productos apiarios presentaron compuestos nutricionales significativos en la salud humana como el magnesio, potasio, ácidos grasos, ácido L-ascórbico ácido L-dehidroascórbico, ácido ferúlico y ácido cafeico.

\*Los parámetros de calidad (luminosidad, pH, acidez e HMF) se vieron afectados por la temperatura y el tiempo de almacenamiento, siendo el contenido de HMF el valor crítico para establecer su estabilidad.

\*Con respecto a la evaluación sensorial durante el almacenamiento, mostró mayor aceptación general a causa del decremento en la percepción de los defectos, además de presentar aromas predominantes similares a los reportados para miel.

\*La conservación del alimento de diseño a temperaturas de 24°C y 37°C, propició un decremento en el tiempo de vida media comparado con el almacenamiento en refrigeración, lo cual sugiere, que para controlar este mecanismo es necesario conservar el producto a 4°C.

\*El contenido y capacidad antioxidante durante el almacenamiento, presentó una ligera tendencia a la disminución del contenido fenólico total, cambiante para los ensayos de capacidad antioxidante y manteniendo una actividad quelante alrededor del 40%.

\*Durante el almacenamiento, la bioaccesibilidad *in vitro* del contenido fenólico total y la capacidad antioxidante aumentó considerablemente, a excepción del ensayo DPPH\*.

\*El producto se consideró seguro hasta la dosis de 1000 mg/kg/día, sin ocasionar muerte, perjudicar el peso ni daño en órganos en los animales de experimentación.

\*El alimento de diseño manifestó un impacto positivo sobre los niveles de urea y ácido úrico en suero y orina, sin ocasionar cambios en la glicemia y el peso de los animales de

experimentación, además de mostrar a través de la histología, una atenuación de las lesiones asociadas a la litiasis renal.

## **10. RECOMENDACIONES**

Un análisis más profundo sobre las propiedades del alimento de diseño, en su fase clínica y preclínica, permitirá ampliar las deducciones establecidas, por tanto, se propone considerar los siguientes análisis como perspectivas futuras:

- Estudios moleculares, para dilucidar mecanismos de acción del alimento de diseño.
- Estudio genómico del efecto regulador del producto, sobre genes asociados a la litiasis renal.
- Análisis del efecto de su consumo en pacientes sanos, como una fase previa a evaluar su potencial en pacientes con la patología.
- Comparar los efectos observados con algún fármaco o producto funcional disponible en el mercado, que se utilice actualmente para el tratamiento y control de la enfermedad.

## 11. REFERENCIAS

1. Couser W, Remuzzi G, Mendis S, Tonelli M. The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases. *Kidney Int.* 2011;80:1258–1270.
2. Levey A, De Jong P, Coresh J, El Nahas M, Astor BC, Matsushita K, et al. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int.* 2011;80:17–28.
3. López M, Hoppe B. History, epidemiology and regional diversities of urolithiasis. *Pediatr Nephrol.* 2010;25:49–59.
4. Gindi S, Methra T, Chandu B, Boyina R, Dasari V. Antiurolithiatic and invitro antioxidant activity of leaves of *Ageratum conyzoides* in rat. *World J Pharm Pharm Sci.* 2013;2:639–49.
5. Taylor E, Stampfer M, Curhan G. Obesity, weight gain, and the risk of kidney stones. *JAMA J Am Med Assoc.* 2005;293(4):455–462.
6. Ferraro P, Taylor E, Gambaro G, Curhan G. Soda and other beverages and the risk of kidney stones. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8:1389–1395.
7. Taylor E, Fung T, Curhan G. DASH-style diet associates with reduced risk for kidney stones. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:2253–2259.
8. Taylor E, Stampfer M, Curhan G. Dietary factors and the risk of incident kidney stones in men: New insights after 14 years of follow-up. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:3225–3232.
9. Curhan G, Willett W, Knight E, Stampfer M. Dietary factors and the risk of incident kidney stones in younger women: Nurses' Health Study II. *Arch Intern Med.* 2004;164:885–891.
10. Goraya N, Wesson D. Dietary interventions to improve outcomes in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015;505–510.
11. Meschi T, Maggiore U, Fiaccadori E, Schianchi T, Bosi S, Adorni G, et al. The effect of fruits and vegetables on urinary stone risk factors. *Kidney Int.* 2004;66:2402–2410.
12. Aslan Z, Aksoy L. Anti-inflammatory effects of royal jelly on ethylene glycol induced renal inflammation in rats. *Int Braz J Urol.* 2015;41(5):1008–13.
13. Al-Waili N, Saloom K, Al-Waili T, Al-Waili A, Akmal M, Al-Waili F. Influence of

various diet regimens on deterioration of hepatic function and hematological parameters following carbon tetrachloride: a potential protective role of natural honey. *Nat Prod Res.* 2006;20(13):1258-1264.

14. Narter F, Diren A, Kafkaslı A, Eronat AP, Seyhan MF, Yılmaz-Aydoğan H, et al. Anatolian propolis prevents oxalate kidney stones: Dramatic reduction of crystal deposition in ethylene-glycol-induced rat model. *Rec Nat Prod.* 2018;12(5):445–59.
15. El-Guendouz S, Al-Waili N, Aazza S, Elamine Y, Zizi S, Al-Waili T, et al. Antioxidant and diuretic activity of co-administration of *Capparis spinosa* honey and propolis in comparison to furosemide. *Asian Pac J Trop Med.* 2017;10(10):974–80.
16. Fihri A, Al-Waili N, El-Haskoury R, Bakour M, Amarti A, Ansari M, et al. Protective effect of Morocco carob honey against lead-induced anemia and hepato-renal. *Cell Physiol Bio- chem.* 2016;39(1):115–22.
17. Kohsaka R, Park M, Uchiyama Y. Beekeeping and honey production in Japan and South Korea: past and present. *J Ethn Foods.* 2017;4(2):72–9.
18. Álvarez Suárez JM, Tulipani S, Romandini S, Bertoli E, Battino M. Contribution of honey in nutrition and human health: A review. *Med J Nutrition Metab.* 2010;3(1):15–23.
19. Subramanian R, Hebbar HU, Rastogi NK. Processing of honey: A review. *Int J Food Prop.* 2007;10(1):127–43.
20. Wakhle D, Phadke R. Design for honey processing unit part I. *Indian Bee J.* 1995;57:144–6.
21. National Farmers Information Service. *Honey Processing.* Kenya; 2016.
22. Kowalski S, Lukasiqwicz M, Bednarz S, Panus M. Diastase number changes during thermal and microwave processing of honey. *Czech J Food Sci.* 2012;30:21–6.
23. Kaur R, Kumar NR, Harjai K. Phytochemical analysis of different extracts of bee pollen. *Int J Pharm Biol Res.* 2013;4(3):65–8.
24. Clarke D, Morley E, Robert D. The bee, the flower, and the electric field: Electric ecology and aerial electroreception. *J Comp Physiol.* 2017;203:737–748.
25. Saavedra KI, Rojas C, Delgado GE. Características polínicas y composición química del polen apícola colectado en Cayaltí (Lambayeque-Perú). *Rev Chil Nutr.* 2013;40:71–8.

26. Thakur M, Nanda V. Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends Food Sci Technol.* 2020;98:82–106.
27. Isidorov VA, Czyzewska U, Isidorova AG, Bakier S. Gas chromatographic and mass spectrometric characterization of the organic acids extracted from some preparations containing lyophilized royal jelly. *J Chromatogr B.* 2009;877(29):3776–80.
28. Srisuparbh D, Klinbunga S, Wongsiri S, Sittipraneed S. Isolation and characterization of major royal jelly cDNAs and proteins of the honey bee (*Apis cerana*). *J Biochem Mol Biol.* 2003;36(6):572–9.
29. Chen S, Su S, Lin X. An introduction to high-yielding royal jelly production methods in China. *Bee World.* 2002;83(2):69–77.
30. Zheng H, Hu F, Dietemann V. Changes in composition of royal jelly harvested at different times: consequences for quality standards. *Apidologie.* 2011;42(1):39–47.
31. Sun C, Wu Z, Wang Z, Zhang H. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2015;2015:1–9.
32. Huang S, Zhang C-P, Wang K, Li G, Hu F-L. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules.* 2014;19:19610–32.
33. Krell R. Value-Added Products from Beekeeping. FAO Agricultural Services. Boletín,12. Roma, Italia: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 1996.
34. Manrique AJ. Selección de abejas africanizadas para a melhoria na produção de própolis. Universidade de São Paulo; 2001.
35. Soto Muciño LE, Elizarraras Baena R, Soto Muciño I. Situación apícola en México y perspectiva de la producción de miel en el Estado de Veracruz. *Rev Estrategias del Desarro Empres.* 2017;3(7):40–64.
36. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Avance comparativo por producto de la producción pecuaria. 2019 [cited 2021 Feb 9].
37. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Panorama agroalimentario 2019. México; 2019. Agroalimentario-2019
38. INEGI. Anuario estadístico. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México; 2018.



39. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario Estadístico de la Producción. México: Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural; 2019.
40. Goderska K, Gumienna M, Czarnecki Z. Release of phenolic compounds from bean flour, bean-derived chips and black chokeberry juice and changes in their antioxidant activity during digestion in an *in vitro* gastrointestinal model. Polish J Food Nutr Sci. 2008;58(4):497–501.
41. de Pascual-Teresa S, Moreno DA, García-Viguera C. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. Int J Mol Sci. 2010;11(4):1679–703.
42. Zhang H, Tsao R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. Curr Opin Food Sci. 2016;8:33–42.
43. Rule AD, Krambeck AE, Lieske JC. Chronic kidney disease in kidney stone formers. Clin J Am Soc Nephrol. 2011;6(8):2069–75.
44. Abib A, Del Valle EE, Laham G, Spicacow F. Litiasis renal y riesgo cardiovascular. Rev Nefrol Dial Traspl. 2019;39(2):126–33.
45. Gómez Ayala AE. Litiasis Renal: Etiopatogenia, clínica y factores de riesgo. Rev Clínica Med Fam. 2008;2(2):44–7.
46. Knoll T. Epidemiology, pathogenesis and pathophysiology of urolithiasis. Eur Urol Suppl. 2010;9(12):802–6.
47. Chhiber N, Sharma M, Kaur T, Singla S. Mineralization in health and mechanism of kidney stone formation. Int J Pharm Sci Invent. 2014;3:25–31.
48. Yuen J, Gohel M, Poon N, Shum D, Tam P, Au D. The initial and subsequent inflammatory events during calcium oxalate lithiasis. Clin Chim Acta. 2010;411:1018–1026.
49. Khan S. Reactive oxygen species, inflammation and calcium oxalate nephrolithiasis. Transl Androl Urol. 2014;3:256–76.
50. Cornara L, Biagi M, Xiao J, Burlando B. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. Front Pharmacol. 2017;8:1–20.
51. Chen C, Chen S-Y. Changes in protein components and storage stability of royal jelly under various conditions. Food Chem. 1995;54(2):195–200.
52. Bankova V, Bertelli D, Borba R, Conti B, da Silva Cunha, IB Danert C, Eberlin M, et

- al. Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *J Apic Res.* 2016;58(2):1–49.
53. Denisow B, Denisow-Pietrzyk M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *J Sci Food Agric.* 2016;96(13):4303–9.
  54. Kostić A, Pešić MB, Trbović D, Petronijević R, Dramićanin AM, Milojković-Opsenica DM, et al. The fatty acid profile of Serbian bee-collected pollen, a chemotaxonomic and nutritional approach. *J Apic Res.* 2017;56(5):533–42.
  55. Terada Y, Narukawa M, Watanabe T. Specific hydroxy fatty acids in royal jelly activate TRPA1. *J Agric Food Chem.* 2011;59:2627–2635.
  56. Stocker A, Schramel P, Kettrup A, Bengsch E. Trace and mineral elements in royal jelly and homeostatic effects. *J Trace Elem Med Biol.* 2005;19:183–9.
  57. Rebiai A, Belfar ML, Mesbahi MA, Nani S, Tliba A, Amara DG, et al. Fatty acid composition of Algerian propolis. *J Fundam Appl Sci.* 2017;9(3):1656–71.
  58. Komosinska-Vassev, K Olczyk P, Kaźmierczak J, Mencner L, Olczyk K. Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. *Evid Based Complement Altern Med.* 2015;2015:297425.
  59. Cvek J, Medic-Saric M, Vitali D, Vedrina-Dragojevic I, Smit Z, Tomić S. The content of essential and toxic elements in Croatian propolis samples and their tinctures. *J Apic Res.* 2008;47(1):35–45.
  60. Suto M, Kawashima H, Nakamura Y. Determination of organic acids in honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Anal Methods.* 2020;13:2249–2257.
  61. Kalaycıoğlu, Zeynep Kaygusuz H, Döker S, Kolaylı S, Erim F. Characterization of Turkish honeybee pollens by principal component analysis based on their individual organic acids, sugars, minerals, and antioxidant activities. *LWT - Food Sci Technol.* 2017;84:402–8.
  62. Nafea E, EL Mohandes S. Determination and identification of organic acids in three types of royal jelly. *J Plant Prot Pathol.* 2011;2(10):873–81.
  63. Padrón González A, Domínguez, Adrián Naranjo A, Díaz Gallardo JJ, Llera Almenteros RE. El propóleo una alternativa de todos los tiempos. *Univ Médica Pinareña.* 2012;8(1):1–15.

64. Cheung Y, Meenu M, Yu X, Xu B. Phenolic acids and flavonoids profiles of commercial honey from different floral sources and geographic sources. *Int J Food Prop.* 2019;22(1):290–308.
65. Oroian M, Ropciuc S. Honey authentication based on physicochemical parameters and phenolic compounds. *Comput Electron Agric.* 2017;138:148–56.
66. Kanbur M, Eraslan G, Silici S, Karabacak M. Effects of sodium fluoride exposure on some biochemical parameters in mice: evaluation of the ameliorative effect of royal jelly applications on these parameters. *Food Chem Toxicol.* 2009;47(6):1184–9.
67. Woźniak M, Mrówczyńska L, Waśkiewicz A, Rogoziński T, Ratajczak I. Phenolic profile and antioxidant activity of propolis extracts from Poland. *Nat Prod Commun.* 2019;14(5):1–7.
68. Rodgers A. Physicochemical mechanisms of stone formation. *Urolithiasis.* 2017;45:27–32.
69. Wang Z, Zhang Y, Zhang J, Deng Q, Liang H. Recent advances on the mechanisms of kidney stone formation (Review). *Int J Mol Med.* 2021;48(2):1–10.
70. Parmar M. Kidney stones. *Br Med J.* 2004;328(7453):1420–4.
71. Kumar S, Kumar K, Srinivasa V, Bilal S. A review on urolithiasis. *Int J Univers Pharm Life Sci.* 2012;2(2):269–80.
72. Basavaraj D, Biyani C, Browning A, Cartledge J. The role of urinary kidney stone inhibitors and promoters in the pathogenesis of calcium containing renal stones. *EAU-EBU Updat Ser.* 2007;5(3):126–36.
73. Aggarwal K, Narula S, Kakkar M, Tandon C. Nephrolithiasis: molecular mechanism of renal stone formation and the critical role played by modulators. *Biomed Res Int.* 2013;2013:292953.
74. Ratkalkar V, Kleinman G. Mechanisms of stone formation. *Clin Rev Bone Miner Metab.* 2011;9(3–4):187–97.
75. Schepers M, Vander B, Romijn J, Schröderand F, Verkoelen C. Urinary crystallization inhibitors do not prevent crystal binding. *J Urol.* 2002;167(4):1844–1847.
76. Courbebaisse M, Prot-Bertoye C, Bertocchio J, Baron S, Maruani G, Briand S, et al. Nephrolithiasis of adult: from mechanisms to preventive medical treatment. *Rev*

- Medicale Int. 2017;38(1):44–52.
77. Tsujihata M. Mechanism of calcium oxalate renal stone formation and renal tubular cell injury. *Int J Urol*. 2008;15(2):115–20.
  78. Moryama M, Domiki C, Miyazawa K, Tanaka T, Suzuki K. Effects of oxalate exposure on Madin-Darby canine kidney cells in culture: renal prothrombin fragment-1 mRNA expression. 2005;33(6):470–5.
  79. Khan S, Glenton P, Backov R, Talham D. Presence of lipids in urine, crystals and stones: Implications for the formation of kidney stones. *Kidney Int*. 2002;62(6):2062–2072.
  80. Fasano J, Khan S. Intra-tubular crystallization of calcium oxalate in the presence of membrane vesicles: an *in vitro* study. *Kidney Int*. 2001;59:169–178.
  81. Nalini HS, Manickavasakam K, Thomas MW. Prevalence and risk factors of kidney stone. *Int J Ophthalmol*. 2016;8(5):183–7.
  82. Ortigón-Gallareta R, Aguilar-Moreno J, Pech-Cervantes PI, Álvarez-Baeza A, Méndez-Domínguez N. Epidemiologic profile of hospitalizations due to urolithiasis in the state of Yucatán, Mexico. *Rev Mex Urol*. 2019;79(5):1–11.
  83. Liu Y, Li S, Zeng Z, Wang J, Xie L, Li T, et al. Kidney stones and cardiovascular risk: A meta-analysis of cohort studies. *Am J Kidney Dis*. 2014;64(3):402–10.
  84. Brikowski T, Lotan Y, Pearle M. Climate related increase in the prevalence of urolithiasis in the United States. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105:9841–6.
  85. Medina-Escobedo M, Zaidi M, Real-de León E, Orozco-Rivadeneira S. Prevalencia y factores de riesgo en Yucatán, México, para litiasis urinaria. *Salud Publica Mex*. 2002;44(6):541–5.
  86. Courbebaisse M, Daudon M. Litiasis renal y nefrocalcinosis. *EMC - Tratado Med*. 2016;20(4):1–6.
  87. Jung H, Andonian S, Assimos D, Averch T, Geavlete P, Kohjimoto Y, et al. Urolithiasis: evaluation, dietary factors, and medical management: an update of the 2014 SIU-ICUD international consultation on stone disease. *World J Urol*. 2017;35:1331–1340.
  88. Singh P, Knoedler JJ, Krambeck AE, Lieske JC, Bergstralh EJ, Rule AD. Thiazide Diuretic Prophylaxis for Kidney Stones and the Risk of Diabetes Mellitus. *J Urol*.

- 2014;192(6):1700–1704.
89. Palermo A, Naciu A, Tabacco G, Manfrini S, Trimboli P, Vescini F, et al. Calcium citrate: from biochemistry and physiology to clinical applications. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. *Rev Endocr Metab Disord*. 2019;20(3):353–64.
  90. Chung J, Granja I, Taylor M, Mpourmpakis G, Asplin J, Rimer J. Molecular modifiers reveal a mechanism of pathological crystal growth inhibition. *Nature*. 2016;536:446–450.
  91. Pearle M, Goldfarb D, Assimos D. Medical management of kidney stones: AUA guideline. *J Urol*. 2014;192:316–332.
  92. Cilla A, Bosch L, Barberá R, Alegría A. Effect of processing on the bioaccessibility of bioactive compounds – A review focusing on carotenoids, minerals, ascorbic acid, tocopherols and polyphenols. *J Food Compos Anal*. 2018;68:3–15.
  93. Cardoso C, Afonso C, Lourenço H, Costa S, Nunes ML. Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk-benefit evaluation of food. *Trends Food Sci Technol*. 2015;41(1):5–23.
  94. Guldas M, Gurbuz O, Cakmak I, Yildiz E, Sen H. Effects of honey enrichment with *Spirulina platensis* on phenolics, bioaccessibility, antioxidant capacity and fatty acids. *LWT - Food Sci Technol*. 2022;153:112461.
  95. Cianciosi D, Forbes-Hernández, T Y Giampieri F, Zhang J, Ansary J, Pacetti M, Quiles JL, et al. Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant activity of manuka honey. *eFood*. 2020;1(1):85–93.
  96. Aylanc V, Tomás A, Russo-Almeida P, Falcão SI, Vilas-Boas M. Assessment of bioactive compounds under simulated gastrointestinal digestion of bee pollen and bee bread: Bioaccessibility and antioxidant activity. *Antioxidants*. 2021;10(5).
  97. Ozkan K, Sagcan N, Ozulku G, Sagdic O, Toker OS, Muz MN. Bioactive and bioaccessibility characteristics of honeybee pollens collected from different regions of Turkey. *J Food Meas Charact*. 2018;12(1):581–7.
  98. Altiner DD, Altunatmaz SS, Sabuncu M, Aksu F. In-vitro bioaccessibility of antioxidant properties of bee pollen in Turkey. *Food Sci Technol*. 2020;41(Suppl. 1):133–41.

99. Turkut G., Mehtap ER, Degirmenci A. Evaluating bioactivity and bioaccessibility properties of Turkish propolis extracts prepared with various solvents. *J Apitherapy Nat.* 2019;2(1):7–11.
100. Ozdal T, Ceylan FD, Eroglu N, Kaplan M, Olgun EO, Capanoglu E. Investigation of antioxidant capacity, bioaccessibility and LC-MS/MS phenolic profile of Turkish propolis. *Food Res Int.* 2019;122(January):528–36.
101. Hina Kausar S, Ram More V. Determination of medium lethal dose (LD<sub>50</sub> Value) for oral acute toxicity of royal jelly. *World J Pharm Pharm Sci.* 2019;8(6):475–81.
102. Sun Y, Shen Z, Jia Z, Miao X. Safety evaluation of an apitherapy formulation , Bao-Yuan-Ling : acute and sub-acute oral toxicity in Wistar rats. *Curr Top Nutraceutical Res.* 2019;17(1):85–92.
103. Azaryan E, Malekaneh M, Shemshadi Nejad, M Haghighi F. Therapeutic effects of aqueous extracts of *Cerasus Avium* Stem on ethylene glycol- induced kidney calculi in rats. *Urol J.* 2017;14(4):4024–4029.
104. Sikarwar I, Dey Y, Wanjari M, Sharma A, Gaidhani S, Jadhav A. *Chenopodium album* Linn. leaves prevent ethylene glycol-induced urolithiasis in rats. *J Ethnopharmacol.* 2017;195:275–82.
105. Panigrahi P, Dey S, Sahoo M, Dan A. Antiurolithiatic and antioxidant efficacy of *Musa paradisiaca pseudostem* on ethylene glycol-induced nephrolithiasis in rat. *Indian J Pharmacol.* 2017;49(1):77–83.
106. Partovi N, Ebadzade M, Fatemi S, Khaksari M. Effect of fruit extract on renal stone formation and kidney injury in rats. *Nat Prod Res.* 2018;32(10):1180–3.
107. Saremi J, Kargar Jahromi, H Pourahmadi M. Effect of Polygonum Aviculare L. on nephrolithiasis induced by ethylene glycol and ammonium chloride in rats. *Urol J.* 2018;15(3):79–82.
108. Das P, Kumar K, Nambiraj A, Rajan R, Awasthi R, Dua K. Potential therapeutic activity of *Phlogacanthus thyriformis* Hardow (Mabb) fower extract and its biofabricated silver nanoparticles against chemically induced urolithiasis in male Wistar rats. *Int J Biol Macromol.* 2017;103:621–9.
109. Saremi J, Kargar-Jahroomi, H Poorahmadi M. Effect of Malva Neglecta Wallr on ethylene glycol induced kidney stones. *Urol J.* 2015;12(6):2387–2390.

110. Safari HR, Esmaeili S, Naghizadeh MS, Falahpour M, Malekaneh M, Anani Sarab GR. The effects of aqueous extract of *Eryngium Campestre* on ethylene glycol-induced calcium oxalate kidney stone in rats. *Urol J.* 2019;16(6):519–24.
111. Sharma I, Khan W, Parveen R, Alam MJ, Ahmad I, Ansari MHR, et al. Antiuro lithiasis activity of bioactivity guided fraction of *Bergenia ligulata* against ethylene glycol induced renal calculi in rat. *Biomed Res Int.* 2017;2017:1969525.
112. Akanae W, Tsujihata M, Yoshioka I, Nonomura N, Okuyama A. *Orthosiphon grandiflorum* has a protective effect in a calcium oxalate stone forming rat model. *Urol Res.* 2010;38(2):89–96.
113. Velu V, Das M, Raj N, Dua K, Malipeddi H. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* antiuro lithiatic activity of silver nanoparticles containing aqueous leaf extract of *Tragia involucrata*. *Drug Deliv Transl Res.* 2017;7(3):439–49.
114. Kadri SM, Zaluski R, Orsi R de O. Nutritional and mineral contents of honey extracted by centrifugation and pressed processes. *Food Chem.* 2017;218:237–41.
115. Patel VB, Acharya N. Effect of *Macrotyloma uniflorum* in ethylene glycol-induced urolithiasis in rats. *Heliyon.* 2020;6(6):e04253.
116. Ilbey Y, Ozbek E, Simsek A, Cekmen M, Somay A, Tasci A. Effects of pomegranate juice on hyperoxaluria-induced oxidative stress in the rat kidneys. *Ren Fail.* 2009;31(6):522–31.
117. Touhami M, Laroubi A, Elhabazi K, Loubna F, Zrara I, Eljahiri Y, et al. Lemon juice has protective activity in a rat urolithiasis model. *BMC Urol.* 2007;7:18.
118. Bawari S, Sah A, Tewari D. Discovering the antiuro lithiatic potential of wild himalayan cherry through *in vitro* and preclinical investigations. *South African J Bot.* 2022;145:218–27.
119. Tayef-Nasrabadi, H Sadigh-Eteghad, S, Aghdam Z. The effects of the hydroalcohol extract of *Rosa canina* L. fruit on experimentally nephrolithiasic Wistar rats. *Phytother Res.* 2012;26(1):78–85.
120. Saha S, Verma R. Antinephrolithiatic and antioxidative efficacy of *Dolichos biflorus* seeds in a lithiasic rat model. *Pharm Biol.* 2015;53(1):16–30.
121. Shah J, Patel B, Patel S, Patel R. Antiuro lithiatic and antioxidant activity of *Hordeum vulgare* seeds on ethylene glycol-induced urolithiasis in rats. *Indian J Pharmacol.*

- 2012;44(6):672–7.
122. Shehzad A, Saleem U, Shah M, Vargas-de la Cruz C, Khan A, Ahmad B. Antiurolithic evaluation of Cucurbita pepo seeds extract against sodium oxalate-induced renal calculi. *Pharmacogn Mag.* 2020;16:S174-180.
  123. El Menyiy N, Al Waili N, Bakour M, Al-Waili H, Lyoussi B. Protective effect of propolis in proteinuria, crystaluria, nephrotoxicity and hepatotoxicity induced by ethylene glycol ingestion. *Arch Med Res.* 2016;47(7):526–34.
  124. Aksoy L, Aslan Z. Nephroprotective and antioxidative effects of royal jelly on ethylene glycol induced nephropathy in rats. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 2017;64(4):241–8.
  125. Imtara H, Al-Waili N, Bakour M, Al-Waili W, Lyoussi B. Evaluation of antioxidant, diuretic, and wound healing effect of Tulkarm honey and its effect on kidney function in rats. *Vet World.* 2018;11(10):1491–9.
  126. Cunningham J, Rodríguez M, Messa P. Magnesium in chronic kidney disease Stages 3 and 4 and in dialysis patients. *CKJ Clin Kidney J.* 2012;5(SUPPL. 1).
  127. Laranjinha I, Matias P, Dickson J. Magnesium supplementation to prevent recurrence of renal stones. *Port J Nephrol Hypertens.* 2019;33(4).
  128. Eisner B, Sheth S, Dretler S, Herrick B, Pais Jr V. High dietary magnesium intake decreases hyperoxaluria in patients with nephrolithiasis. *Endourol Stones.* 2012;80(4):780–3.
  129. Albaalbaki F, Narayanan M. Low Urine Citrate/Magnesium/ Potassium. In: *Nutrition therapy for urolithiasis.* Springer International Publishing; 2018. p. 115–24.
  130. Grases F, Rodriguez A, Costa-Bauza A. Efficacy of mixtures of magnesium, citrate and phytate as calcium oxalate crystallization inhibitors in urine. *J Urol.* 2015;194(3):812–9.
  131. Manzoor MAP, Duwal SR, Mujeeburahiman M, Rekha PD. Vitamin C inhibits crystallization of struvite from artificial urine in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int Braz J Urol.* 2018;44(6):1234–42.
  132. Abdel-Daim M, Taha R, Ghazy E, El-Sayed Y. Synergistic ameliorative effects of sesame oil and alpha-lipoic acid against subacute diazinon toxicity in rats: hematological, biochemical, and antioxidant studies. *Can J Physiol Pharmacol.*



2016;94(1):81–8.

133. Abdou R, Abdel-Daim M. Alpha-lipoic acid improves acute deltamethrin-induced toxicity in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2014;92(9):773–9.
134. Zee T, Bose N, Zee J, Beck J, Yang S, Parijhar J, et al.  $\alpha$ -Lipoic acid treatment prevents cystine urolithiasis in a mouse model of cystinuria. *Nat Med*. 2017;23:288–90.
135. Yoon H-Y, Kang N-I, Lee H-K, Yang K, Park J-W, Park B-H. Sulforaphane protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through induction of the Nrf2- dependent phase 2 enzyme. *Biochem Pharmacol*. 2008;75:2214– 2223.
136. Şehirli Ö, Şener E, Çetinel Ş, Yüksel M, Gedik N, Şener G.  $\alpha$ -lipoic acid protects against renal ischaemia–reperfusion injury in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008;35(3):249–55.
137. El-Beshbishy H, Bahashwan S, Aly H, Fakher H. Abrogation of cisplatin-induced nephrotoxicity in mice by alpha lipoic acid through ameliorating oxidative stress and enhancing gene expression of antioxidant enzymes. *Eur J Pharmacol*. 2011;668(1):278–84.
138. Shanmugarajan T, Sivaraman D, Somasundaram I, Arunsundar M, Krishnakumar E, Balaji R. Influence of alpha lipoic acid on antioxidant status in D-galactosamine-induced hepatic injury. *Toxicol Ind Health*. 2008;24(10):635–42.
139. Irmak MK, Koltuksuz U, Kutlu NO, Yağmurca M, Özyurt HI, Karaman A, et al. The effect of caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury in comparison with  $\alpha$ -tocopherol in rat kidneys. *Urol Res*. 2001;29(3):190–3.
140. Gurel A, Armutcu F, Sahin S, Sogut S, Ozyurt H, Gulec M, et al. Protective role of  $\alpha$ -tocopherol and caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury via nitric oxide and myeloperoxidase in rat kidneys. *Clin Chim Acta*. 2004;339(1–2):33–41.
141. Roso NC, Correa RRM, Castiglia YMM, Carvalho LR, Scatena LM, De Souza AVG, et al. Caffeic acid phenethyl ester effects in the kidney during ischemia and reperfusion in rats anesthetized with isoflurane. *Transplant Proc*. 2012;44(5):1211–3.
142. Aygün FÖ, Akçam FZ, Kaya O, Ceyhan BM, Sütçü R. Caffeic acid phenethyl ester modulates gentamicin-induced oxidative nephrotoxicity in kidney of rats. *Biol Trace Elem Res*. 2012;145(2):211–6.
143. Bami E, Ozakpınar O, Ozdemir-Kumral Z, Köroğlu K, Ercan F, Ciraklı Z, et al.

- Protective effect of ferulic acid on cisplatin induced nephrotoxicity in rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2017;54:105–11.
144. Manikandan R, Beulaja M, Thiagarajan R, Pandi M, Arulvasu C, Prabhu N, et al. Ameliorative effect of ferulic acid against renal injuries mediated by nuclear factor-kappaB during glycerol-induced nephrotoxicity in Wistar rats. *Ren Fail.* 2014;36(2):164–5.
  145. Lampiasi N, Montana G. The molecular events behind ferulic acid mediated modulation of IL-6 expression in LPS-activated raw 264.7 cells. *Immunobiology.* 2016;221(3):154–65.
  146. Goetzke B, Spiller A. Health-improving lifestyles of organic and functional food consumer. *Br Food J.* 2014;116(3):510–26.
  147. Olagnero G, Genevois C, Irei V, Marcenado J, Bendersky S. Functional foods: concepts, definitions and global legal frame. *Diaeta.* 2007;25(119):33–41.
  148. Manjula K, Suneetha C. Designer foods-their role in preventing lifestyle disorders. *Int J Sci Nat.* 2011;2(4):878–82.
  149. Soubhagya M, Abhijeet C, Popalghat HK. Designer egg: A new approach in modern health care. *Pharma Innov J.* 2018;7(5):320–6.
  150. Sireescha P, Prassana S. Designer eggs and poultry meat as functional foods – An overview. *Pharma Innov J.* 2019;8(4):829–31.
  151. Kerry JF, Kerry JP. Producing low-fat meat products. In: Williams C & BJ, editor. *Improving the Fat Content of Foods.* Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC; 2006. p. 336–379.
  152. Navajas E., Simm G. DNAMarkers and marker-assisted selection. In: W. Jensen, C. Devine & MD, editor. *Encyclopaedia of meat sciences.* London (UK): Elsevier Science Ltd; 2004. p. 19–27.
  153. Jiménez-Colmenero, F Sanchez-Muniz F, Olmedilla-Alonso B. Design and development of meat-based functional foods with walnut: Technological, nutritional and health impact. *Food Chem.* 2010;123:959–967.
  154. Arihara K. Functional foods. In: W. Jensen, C. Devine & MD, editor. *Encyclopaedia of meat sciences.* London, UK: Elsevier Science Ltd; 2004. p. 492–499.
  155. Bhushan S, Kalia K, Sharma M, Singh B, Ahuja PS. Processing of apple pomace for

- bioactive molecules. *Crit Rev Biotechnol*. 2008;28(4):285–96.
156. Díaz-Batalla L, Hernández-Urbe JP, Gutiérrez-Dorado R, Téllez-Jurado A, Castro-Rosas J, Pérez-Cadena R, et al. Nutritional characterization of *Prosopis laevigata* legume tree (mesquite) seed flour and the effect of extrusion cooking on its bioactive components. *Foods*. 2018;7(8):1–9.
  157. Pérez-Flores JG, Contreras-López E, Castañeda-Ovando A, Pérez-Moreno F, Aguilar-Arteaga K, Álvarez-Romero GA, et al. Physicochemical characterization of an arabinoxylan-rich fraction from brewers' spent grain and its application as a release matrix for caffeine. *Food Res Int*. 2019;116(August 2018):1020–30.
  158. Pinedo-Espinoza JM, Gutiérrez-Tlahque J, Santiago-Saenz YO, Aguirre-Mancilla CL, Reyes-Fuentes M, López-Palestina CU. Nutritional composition, bioactive compounds and antioxidant activity of wild edible flowers consumed in semiarid regions of Mexico. *Plant Foods Hum Nutr*. 2020;75:413–9.
  159. Sawicki T, Baczek N, Starowicz M. Characterisation of the total phenolic, vitamins C and E content and antioxidant properties of the beebread and honey from the same batch. *Czech J Food Sci*. 2020;38(3):158–63.
  160. Zhu M, Tang J, Tu X, Chen W. Determination of ascorbic acid, total ascorbic acid, and dehydroascorbic acid in bee pollen using hydrophilic interaction liquid chromatography-ultraviolet detection. *Molecules*. 2020;25(5996):1–10.
  161. Ruiz-Rodríguez BM, Morales P, Fernández-Ruiz V, Sánchez-Mata MC, Cámara M, Díez-Marqués C, et al. Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data. *Food Res Int* [Internet]. 2011;44(5):1244–53.
  162. Añorve-Morga, J Castañeda-Ovando, A Cepeda-Saez A, Durant AA, Jaimez-Ordaz, J Contreras-López, E González-Olivares LG, Rodríguez-Rodríguez JL. Microextraction method of medium and long chain fatty acids from milk. *Food Chem*. 2015;172:456–61.
  163. Jarukas L, Kuraite G, Baranauskaite J, Marksa M, Bezruk I, Ivanauskas L. Optimization and validation of the GC/FID method for the quantification of fatty acids in bee products. *Appl Sci*. 2021;11(1):1–10.
  164. Matuszewska E, Klupczynska A, Maciołek K, Kokot ZJ, Matysiak J. Multielemental

- analysis of bee pollen, propolis, and royal jelly collected in west-central Poland. *Molecules*. 2021;26:2415.
165. Lanjwani MF, Channa FA. Minerals content in different types of local and branded honey in Sindh, Pakistan. *Heliyon*. 2019;5(7):e02042.
  166. Tappi S, Laghi L, Dettori A, Piana L, Ragni L, Rocculi P. Investigation of water state during induced crystallization of honey. *Food Chem*. 2019;294:260–6.
  167. NORMEX. NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos. Mexico: DOF (Diario oficial de la Federación); 1978.
  168. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. Method 942.15. 16th Ed. Gatherstoung, E.U.U; 1999.
  169. NORMEX. NMX-F-036-1997. Alimentos-Miel-Especificaciones y métodos de prueba. México: DOF (Diario Oficial de la Nación); 1997.
  170. Wrolstad RE, Durst RW, Lee J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends Food Sci Technol*. 2005;16(9):423–8.
  171. Corradini MG, Peleg M. Prediction of vitamins loss during non-isothermal heat processes and storage with non-linear kinetic models. *Trends Food Sci Technol*. 2006;17(1):24–34.
  172. van Boekel MAJS. Kinetic Modeling of food quality: A critical review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2008;7(1):144–58.
  173. Oancea S. A Review of the Current Knowledge of Thermal Stability of Anthocyanins and Approaches to Their Stabilization to Heat. *Antioxidants*. 2021;10(9):1337.
  174. Liria Domínguez MR. Guía para la evaluación sensorial de alimentos. Instituto de Investigación Nutricional. Perú: Centro Internacional de Agricultura Tropical/AgroSalud; 2007. p. 2–45.
  175. Albo Nazionale degli in Analisi Sensoriale del Miele. Ficha técnica para la valoración y perfil sensorial de la miel multifloral. In: Sancho J, Bota E, De Castro J., editors. *Introducción al análisis sensorial de los alimentos*. México: Alfaomega; 2002. p. 240.
  176. United States Department of Agriculture. United States standards for grades of extracted honey. Vol. Fed. Regis. EUA: United States Department of Agriculture; 1985.
  177. Moumeh B, Dolores Garrido M, Diaz P, Peñaranda I, Linares MB. Chemical analysis

- and sensory evaluation of honey produced by honeybee colonies fed with different sugar pastes. *Food Sci Nutr.* 2020;8(11):5823–31.
178. Bicudo de Almeida-Muradian L, Monika Barth O, Dietemann V, Eyer M, Freitas A da S de, Martel AC, et al. Standard methods for *Apis mellifera* honey research. *J Apic Res.* 2020;59(3):1–62.
  179. Piana ML, Oddo LP, Bentabol A, Bruneau E, Bogdanov S, Declerck CG. Sensory analysis applied to honey: state of the art. *Apidologie.* 2004;35:S26–S37.
  180. Sancho J, Bota E, De Castro J. Defectos apreciables en la miel. In: *Introducción al análisis sensorial de los alimentos.* México: Alfaomega; 2002. p. 233–4.
  181. Stintzing FC, Herbach KM, Mosshammer MR, Carle R, Yi W, Sellappan S, et al. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *J Agric Food Chem.* 2005;53(2):442–51.
  182. Dürüst N, Sümengen D, Dürüst Y. Ascorbic acid and element contents of food of trabzon (Turkey). *J Agric Food Chem.* 1997;8561(96):2085–7.
  183. Morales FJ, Jiménez-Pérez S. Free radical scavenging capacity of maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chem.* 2001;72:119–25.
  184. Kukoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Macini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc TecnolAliment.* 2005;25(4):726–32.
  185. Pérez-Jiménez J, Arranz S, Tabernero M, Díaz- Rubio ME, Serrano J, Goñi I, et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Res Int.* 2008;41(3):274–85.
  186. Gulcin İ, Buyukokuroglu ME, Kufrevioglu OI. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *J Pineal Res.* 2003;34(4):278–81.
  187. Miller ER, Parsons MJ, Ullrey DE, Ku PK. Bioavailability of iron from ferric choline citrate and a ferric copper cobalt choline citrate complex for young pigs. *J Anim Sci.* 1981;52(4):783–7.
  188. Ramírez Moreno E, Zafra Rojas QY, Arias Rico J, Ariza Ortega JA, Alanís García E, Cruz Cansino N. Effect of ultrasound on microbiological load and antioxidant properties of blackberry juice. *J Food Process Preserv.* 2018;42(2):1–6.

189. Van de Velde F, Pirovani ME, Drago SR. Bioaccessibility analysis of anthocyanins and ellagitannins from blackberry at simulated gastrointestinal and colonic levels. *J Food Compos Anal.* 2018;72:22–31.
190. OECD. OECD Guidelines for the testing of chemicals: repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. *Drug Chem Toxicol.* 2008;34(1):13.
191. NIEHS. Notice of peer review meeting on the revised up-and-down procedure (UDP) as an alternative test method for assessing acute oral toxicity. National Toxicology Research Program; 2000. p. 1–8.
192. Arispe Quispe, M. S Callizaya Laura, M. K Laura Yana, A. A Mendoza Mendoza MZ, Mixto Cano JL, Valdez Baltazar BD, Magariños Loredó E, Torrico Arzady W. Importancia del examen general de orina, en el diagnóstico preliminar de patologías de vías urinarias renales y sistémicas, en mujeres aparentemente sanas. *Rev Con-Ciencia.* 2019;7(1):93–102.
193. Azimi A, Eidi A, Mortazavi P, Rohani AH. Protective effect of apigenin on ethylene glycol-induced urolithiasis via attenuating oxidative stress and inflammatory parameters in adult male Wistar rats. *Life Sci.* 2021;Aug(15):279:119641.
194. Nogueira Ferraz R, Mackowiak Fonseca J, Germino GG, Onuchic LF, Pfeferman Heilberg I. Determination of urinary lithogenic parameters in murine models orthologous to autosomal dominant polycystic kidney disease. *Urolithiasis.* 2014;42(4):301–7.
195. Romero-Fernandez W, Batista-Castro Z, De Lucca M, Ruano A, García-Barceló M, Rivera-Cervantes M, et al. The 1, 2, 3 of laboratory animal experimentation. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2016;33(2):288–99.
196. Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth E, Bromage N, Bunyan J, et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission. *Lab Anim.* 1997;31(1):1–32.
197. Leary S, Underwood W, Anthony R, Greenacre C, Gwaltney-Brant S, McCrackin MA, et al. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. Vol. 2020. Schaumburg, USA: American Veterinary Medical Association; 2020. p. 32–40.
198. Villanueva Huallpa JA. Efecto nefroprotector del zumo del fruto de *Opuntia ficus indica* “ tuna ” variedad morada en ratas inducidas a daño renal por gentamicina.

Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.

199. Baños-Gómez R, Cruz-Cansino NS, Suarez-Diéguez T, Valadez-Vega C, Ramírez-Moreno E, Alanís-García E, et al. Undernutrition in the parental and first generation provokes an organ-specific response to oxidative stress on neonates of second filial generation of Wistar rats. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2017;101(2):267–74.
200. College of American of Pathologists. Protocols and Guidelines. Available from: <https://www.cap.org/protocols-and-guidelines>
201. De Florio Almeida J, Soares dos Reis A, Serafini Heldt LF, Pereira D, Bianchin M, De Moura C, et al. Lyophilized bee pollen extract: A natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in refrigerated sausages. *Food Sci Technol*. 2017;76:299–305.
202. Rzepecka-Stojko A, Stojko J, Kurek-Gorecka A, Gorecki M, Kabala-Dzik A, Kubina R. Polyphenols from bee pollen: structure, absorption, metabolism and biological activity. *Molecules*. (2015) 20: Molecules. 2015;20:21732–49.
203. Perna A, Intaglietta I, Simonetti A, Gambacorta E. A comparative study on phenolic profile, vitamin C content and antioxidant activity of Italian honeys of different botanical origin. *Int J Food Sci Technol*. 2013;48(9):1899–908.
204. Chew CY, Chua LS, Soontorngun N, Lee CT. Discovering potential bioactive compounds from Tualang honey. *Agric Nat Resour*. 2018;52(4):361–5.
205. Paniwnyk L, Cai H, Albu S, Mason T, R C. The enhancement and scale up of the extraction of antioxidant from *Rosmarinus officinalis* using ultrasound. *Ultrason Sonochem*. 2009;16:287–92.
206. Ramanathan ANKG, Nair AJ, Sugunan VS. A review on Royal Jelly proteins and peptides. *J Funct Foods*. 2018;44(March):255–64.
207. Jusoh N, Rosly MB, Othman N, Rahman HA, Noah NFM, Sulaiman RNR. Selective extraction and recovery of polyphenols from palm oil mill sterilization condensate using emulsion liquid membrane process. *Environ Sci Pollut Res*. 2020;27(18):23246–57.
208. Dranca F, Oroian M. Optimization of ultrasound-assisted extraction of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) from eggplant (*Solanum melongena* L.). *Ultrason Sonochem*. 2016;31:637–66.
209. Dailey A, Vuong Q V. Effect of extraction solvents on recovery of bioactive

- compounds and antioxidant properties from macadamia (*Macadamia tetraphylla*) skin waste. *Cogent Food Agric.* 2015;1:1115646.
210. Biesaga M, Pyrzynska K. Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. *Food Chem.* 2013;136:46–54.
  211. Oreopoulou V, Tzia C. Utilization of plant by-products for the recovery of proteins, dietary fibers, antioxidants, and colorants. In: Oreopoulou, V; Russ W, editor. *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry.* New York: Springer Science; 2007. p. 209–32.
  212. Escriche I, Juan-Borrás M. Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. *Food Res Int.* 2018;106(November 2017):834–41.
  213. Aarabi A, Honarvar M, Mizani M, Faghihian H, Gerami A. Extraction and purification of ferulic acid as an antioxidant from sugar beet pulp by alkaline hydrolysis. *Ital J Food Sci.* 2016;28(3):362–75.
  214. Zhu W, Xu YF, Feng Y, Peng B, Che JP, Liu M, et al. Prophylactic effects of quercetin and hyperoside in a calcium oxalate stone forming rat model. *Urolithiasis.* 2014;42(6):519–26.
  215. Yuan P, Sun X, Liu X, Hutterer G, Pummer K, Hager B, et al. Kaempferol alleviates calcium oxalate crystal-induced renal injury and crystal deposition via regulation of the AR/NOX2 signaling pathway. *Phytomedicine.* 2021;86(March):153555.
  216. Cechinel-Zanchett, C C Mariano LB, Schlickmann F, Cechinel-Filho V, de Souza P. *In vitro* effects of two bioactive compounds, gallic acid and methyl gallate, on urolithiasis. *Actas Urológicas Españolas (English Ed.* 2021;45(9):604–8.
  217. Yasir F, Iqbal WM. Protective effect of dietary polyphenol caffeic acid on ethylene glycol - induced kidney stones in rats. *Urolithiasis.* 2017;46(2):157–66.
  218. Li Y, Schellhorn H. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J Nutr.* 2007;137:2171–84.
  219. Jacob R, Sotoudeh G. Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutr Clin Care.* 2002;5:66–74.
  220. U.S. Food and Drug Administration. *Food Labeling: revision of the nutrition and supplement facts labels.* USA; 2016.
  221. Deutsch JC. Dehydroascorbic acid. *J Chromatogr A.* 2000;Jun 9(881):299–307.



222. Phillips KM, Tarragó-Trani, M T Gebhardt SE, Exler J, Patterson KY, Haytowitz DB, Pehrsson PR, et al. Stability of vitamin C in frozen raw fruit and vegetable homogenates. *J Food Compos Anal.* 2010;23:253–9.
223. Ferrada L, Salazar K, Nualart F. Metabolic control by dehydroascorbic acid: Questions and controversies in cancer cells. *J Cell Physiol.* 2019;234(11):19331–8.
224. Ferraro P, Curhan G, Gambaro G, Taylor E. Total, dietary, and supplemental vitamin C intake and risk of incident kidney stones. *Am J Kidney Dis.* 2016;67(3):400–7.
225. Jiang K, Tang K, Liu H, Xu H, Ye Z, Chen Z. Ascorbic acid supplements and kidney stones incidence among men and women: a systematic review and meta-analysis. *Urol J.* 2019;16(2):115–20.
226. Forman K, Martínez F, Cifuentes M, Fernández M, Bertinat R, Torres P, et al. Dehydroascorbic acid, the oxidized form of vitamin C, improves renal histology and function in old mice. *J Cell Physiol.* 2020;235(12):9773–84.
227. Estevinho LM, Rodrigues S, Pereira AP, Feas X. Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and micro- biological evaluation. *Intern J Food Sci Technol.* 2012;47:429–435.
228. Mărgăoan R, Mărghitaş LA, Dezmirean DS, Dulf F V, Bunea A, Socaci SAA, et al. Predominant and secondary pollen botanical origins influence the carotenoid and fatty acid profile in fresh honeybee-collected pollen. *J Agric Food Chem.* 2014;62:6306–6316.
229. Al-Kahtani S, Taha EA, Farag SA, Taha RA, Abdou EA, Mahfouz HM. Harvest season significantly influences the fatty acid composition of bee Pollen. *Biol.* 2021;10(6):495.
230. Ahmad S, Campos MG, Fratini F, Altaye SZ, Li J. New insights into the biological and pharmaceutical properties of royal jelly. *Int J Mol Sci.* 2020;21:382.
231. Sabatini AG, Marcazzan GL, Caboni MF, Bogdanov S, De Almedia-Muradian LB. Quality and standardisation of royal jelly. *J ApiProduct ApiMedical Sci.* 2009;1(1):1–6.
232. Makino J, Ogasawara R, Kamiya T, Hara H, Mitsugi Y, Yamaguchi E, et al. Royal jelly constituents increase the expression of extracellular superoxide dismutase through histone acetylation in monocytic THP-1 cells. *J Nat Prod.* 2016;79:1137–

1143.

233. Nabas Z, Haddadin MS, Haddadin J, Nazer IK. Chemical composition of royal jelly and effects of synbiotic with two different locally isolated probiotic strains on antioxidant activities. *Pol J Food Nutr Sci*. 2014;64:171–180.
234. Naik RR, Shakya AK, Oriquat GA, Katekhaye S, Paradkar A, Fearnley H, et al. Fatty acid analysis, chemical constituents, biological activity and pesticide residues screening in Jordanian propolis. *Molecules*. 2021;26(16):5076.
235. Urcan A, Marghitas L, Dezmirean DS, Bobis O, Bonta V. Chemical composition and biological activities of beebread—Review. *Bull Uni Agri Sci Vet Med*. 2017;74:6–14.
236. AFSSA. Avis relatif a l’actualisation des apports nutritionnels conseilles pour les acides gras: saisine Mars 2010. 2010. Available from: [www.afssa.fr](http://www.afssa.fr)
237. Simopoulus A. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio: health implications. *OCL*. 2010;17(5):267–75.
238. Rodgers A, Siener R. The efficacy of polyunsaturated fatty acids as protectors against calcium oxalate renal stone formation: a review. *Nutrients*. 2020;12(4):1069.
239. Farag M, Gad M. Omega-9 fatty acids: potential roles in inflammation and cancer management. *J Genet Eng Biotechnol*. 2022;16(20(1)):48.
240. Kiliç Altun S, Dinç H, Paksoy N, Temamoğullari FK, Savrunlu M. Analyses of mineral content and heavy metal of honey samples from south and east region of Turkey by using ICP-MS. *Int J Anal Chem*. 2017;2017.
241. Nascimento AS do, Marchini LC, Carvalho CAL de, Araújo DFD, Silveira TA da, Olinda RA de. Determining the levels of trace elements Cd, Cu, Pb and Zn in honey of stingless bee (Hymenoptera: Apidae) using voltammetry. *Food Nutr Sci*. 2015;06(07):591–6.
242. Chudzinska M, Debska A, Baralkiewicz D. Method validation for determination of 13 elements in honey samples by ICP-MS. *Accredit Qual Assur*. 2012;17(1):65–73.
243. Taha EKA, Al-Jabr AM, Al-Kahtani SN. Honey bees, bee-collected pollen and honey as monitors of environmental pollution at an industrial cement area in Saudi Arabia. *J Kansas Entomol Soc*. 2017;90(1):1–10.
244. Zoroddu MA, Aaseth J, Crisponi G, Medici S, Peana M, Nurchi VM. The essential metals for humans: A brief overview. *J Inorg Biochem*. 2019;195:120–9.

245. Verkaik-Kloosterman, J McCann M, Hoekstra J, Verhagen H. Vitamins and minerals: Issues associated with too low and too high population intakes. *Food Nutr Res.* 2012;56:5728.
246. Bogdanov S. Contaminants of bee products. *Apidologie.* 2006;37:1–18.
247. Cicero CE, Mostile G, Vasta R, Rapisarda V, Signorelli SS, Ferrante M, et al. Metals and neurodegenerative diseases. A systematic review. *Env Res.* 2017;159:82–94.
248. Matés JM, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J. Roles of dioxins and heavy metals in cancer and neurological diseases using ROS-mediated mechanisms. *Free Radic Biol Med.* 2010;49:1328–41.
249. Unión Europea. Reglamento (UE) 2021/1317. Contenidos máximos de plomo en determinados productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*; 2021.
250. Lugo Melchor OY, Alvarado Osuna C, Ramírez Cerda EL. Inocuidad y trazabilidad en los alimentos mexicanos. México: CIATEJ; 2017. p. 6–10.
251. Rumanta M, Latief A, Rahayu U, Ratnaningsih A, G N. Konsentrasi timbal (Pb) pada perairan di sekitar Teluk Jakarta. *J Mat Sain dan Teknol.* 2008;9(1):31–6.
252. Codex Alimentarius Commission. General Standard for Contaminants and Toxin in Food and Feed. *Codex Standard*; 2016. p. 193–1995.
253. Campos MGR, Bogdanov S, de Almeida-Muradian LB, Szczesna T, Mancebo Y, Frigerio C, et al. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *J Apic Res.* 2008;47(2):154–61.
254. Kostic AZ, Pesic MB, Masic MD, Dojcinovic BP, Natic MM, Trifkovic JD. Mineral content of bee pollen from Serbia. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2015;66(4):251–8.
255. Sandoval Guerrero A. Caracterización fisicoquímica de la miel y propóleo de la abeja nativa sin aguijón (*Trigona angustula*) y elaboración de granola, caramelo y marshmello. [Lima]: Universidad Norbert Wiener; 2023.
256. Wessels I, Rolles B, Rink L. The potential impact of Zinc supplementation on COVID-19 pathogenesis. *Front Immunol.* 2020;11:1712.
257. Patel A, Mamtani M, Dibley M, Badhoniya N, Kulkarni H. Therapeutic value of zinc supplementation in acute and persistent diarrhea: a systematic review. *PLoS One.* 2010;5:10386.
258. Lai J, Moxey A, Nowak G, Vashum K, Bailey K, McEvoy M. The efficacy of zinc

- supplementation in depression: Systematic review of randomized controlled trials. *J Affect Disord.* 2012;136:31–9.
259. Elstrott B, Khan L, Olson S, Raghunathan, V DeLoughery T, Shatzel JJ. The role of iron repletion in adult iron deficiency anemia and other diseases. *Eur J Haematol.* 2020;104:153–61.
  260. Wu J, Yang Z, Wei J, Zeng C, Wang Y, Yang T. Association between serum magnesium and the prevalence of kidney stones: a cross-sectional study. *Biol Trace Elem Res.* 2019;195(1):20–6.
  261. Mohammad, Mehdi Hosseini Shohreh A, Omidbakhsh K, Mohammadali A. Effect of potassium citrate on prevention of recurrence and expulsion of residual fragments of calcium oxalate renal stones. *Trends Pharm Sci.* 2019;3–8.
  262. World Health Organization. Guideline: potassium intake for adults and children. 2012. Available from: [http://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/potassium\\_intake/en/](http://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/potassium_intake/en/)
  263. Palafox López A. Manual de fórmulas y tablas para la intervención nutricional. 2da Ed. Mexico: McGraw-Hill; 2012.
  264. Moreira R, Maria C, Pietroluongo M, Trugo L. Chemical changes in the non-volatile fraction of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. *Food Chem.* 2007;104:1236–41.
  265. Zarei M, Fazlara A, Alijani N. Evaluation of the changes in physicochemical and antioxidant properties of honey during storage. *Funct Foods Heal Dis.* 2019;9(9):593–605.
  266. Monggudal MB, Radzi MNFM, Ismail MM, Ismail WIW. Effect of six month storage on physicochemical analysis and antioxidant activity of several types of honey. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng.* 2018;440(1).
  267. Karabagias IK, Karabournioti S, Karabagias VK, Badeka A V. Palynological, physico-chemical and bioactivity parameters determination, of a less common Greek honeydew honey: “dryomelo.” *Food Control.* 2020;109:106940.
  268. Seraglio SKT, Bergamo G, Molognoni L, Daguer H, Silva B, Gonzaga LV, et al. Quality changes during long-term storage of a peculiar Brazilian honeydew honey: “Bracatinga.” *J Food Compos Anal.* 2021;97(July 2020).

269. Codex Alimentarius Commission. Codex Standard for Honey, FAO. Allinorm 1. 2001;19–26.
270. Zamora M., Chirife J. Determination of water activity change due to crystallization in honeys from Argentina. *Food Control*. 2006;17:59–64.
271. De Rodriguez GO, De Ferrer BS, Ferrer A, Rodriguez B. Characterization of honey produced in Venezuela. *Food Chem*. 2004;84:499–502.
272. Realini C., Marcos B. Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat Sci*. 2014;98:404–419.
273. Liu D, Zhang C, Pu Y, Chen S, Liu L, Cui Z, et al. Recent Advances in pH-Responsive Freshness Indicators Using Natural Food Colorants to Monitor Food Freshness. *Foods*. 2022;11(13):1884.
274. Da Silva PM, Gauche C, Gonzaga L V, Oliveira Costa AC, Fett R. Honey: chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem*. 2016;196:309–323.
275. Severin I, Dumont C, Jondeau-Cabaton A, Graillot V, Chagnon M-C. Genotoxic activities of the food contaminant 5-hydroxymethylfurfural using different *in vitro* bioassays. *Toxicol Lett*. 2010;192(2):189–94.
276. Wang G, Liu P, He J, Yin Z, Yang S, Zhang G, et al. Identification of a 5-Hydroxymethylfurfural–lysine schiff base and its cytotoxicity in three cell lines. *J Agric Food Chem*. 2019;67(36):10214–21.
277. Capuano E, Fogliano V. Acrylamide and 5-Hydroxymethylfurfural (HMF): a review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT- Food Sci Technol*. 2011;44:793–810.
278. Codex Alimentarius. Revised Codex standard for honey. 2001. p. Codex Stan 12:1982.
279. Costa LCV, Kaspchak E, Queiroz MB, Almeida MM de, Quast E, Quast LB. Influence of temperature and homogenization on honey crystallization. *Brazilian J Food Technol*. 2015;18(2):155–61.
280. Román-Leshkov Y, Chheda J, Dumesic J. Phase modifiers promote efficient production of hydroxymethylfurfural from fructose. *Science (80- )*. 2006;312:1933–7.
281. Mouhoubi-Tafnine Z, Ouchemoukh S, Bachir Bey M, Louaileche H, Tamendjari A. Effect of storage on hydroxymethylfurfural (HMF) and color of some Algerian honey. *Int Food Res J*. 2018;25(3):1044–50.

282. Chou W-M, Liao H-C, Yang Y-C, Peng C-C. Evaluation of honey quality with stored time and temperatures. *J Food Nutr Res.* 2020;8(10):591–9.
283. Juszczak L, Florkiewicz A, Socha R, Gałkowska D, Piotrowska A. Effect of honey supplementation with bee products on quality parameters and mineral composition. *Emirates J Food Agric.* 2018;990–7.
284. Labuza TP, Altunakar B. Water activity prediction and moisture sorption isotherms. In: *Water activity in foods: fundamentals and applications.* 2020. p. 161–205.
285. Starzak M, Peacock SD, Mathlouthi M. Hydration number and water activity models for the sucrose-water system: A critical review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2000;40:327–67.
286. Gleiter RA, Horn H, Isengard HD. Influence of type and state of crystallisation on the water activity of honey. *Food Chem.* 2006;96(3):441–5.
287. Subbiah B, Blank UKM, Morison KR. A review, analysis and extension of water activity data of sugars and model honey solutions. *Food Chem.* 2020;326(May):126981.
288. Serin S, Turhan KN, Turhan M. Correlation between water activity and moisture content of Turkish flower and pine honeys. *Food Sci Technol.* 2018;38(2):238–43.
289. Devequi-Nunes D, Souza Machado BA, De Abreu Barreto G, Silva JR, Da Silva D, Carneiro da Rocha JL, et al. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PLoS One.* 2018;13(12):1–20.
290. Brudzynski K, Kim L. Storage-induced chemical changes in active components of honey de-regulate its antibacterial activity. *Food Chem.* 2011;126(3):1155–1163.
291. Badui S. *Química en alimentos.* 4th ed. México: Pearson; 2006. 22,59-62.
292. Kędzierska-Matysek, M. Florek M, Wolanciuk A, Skalecki P, Litwińczuk A. Characterisation of viscosity, colour, 5-hydroxymethylfurfural content and diastase activity in raw rape honey (*Brassica napus*) at different temperatures. *J Food Sci Technol.* 2016;53:2092–2098.
293. Piotraszewska-Pająk A, Gliszczyńska-Świągło A. Directions of colour changes of nectar honeys depending on honey type and storage conditions. *J Apic Sci.* 2015;59(2):51–61.

294. Karabagias IK, Maia M, Karabournioti S, Gatzias I, Karabagias VK, Badeka A V. Palynological, physicochemical, biochemical and aroma fingerprints of two rare honey types. *Eur Food Res Technol.* 2020;246(9):1725–39.
295. Cox KA, McGhie TK, White A, Woolf AB. Skin colour and pigment changes during ripening of ‘Hass’ avocado fruit. *Postharvest Biol Technol.* 2004;31(3):287–94.
296. Alvis A, Villada HS, Villada DC. Efecto de la temperatura y tiempo de fritura sobre las características sensoriales del ñame (*Dioscorea alata*). *Inf Tecnológica.* 2008;19(5).
297. Moujanni A, Partida L, Essamadi AK, Hernanz D, Heredia F., Terrab A. Physicochemical characterization of unique unifloral honey: *Euphorbia resinifera*. *CyTA - J Food.* 2018;16(1):27–35.
298. Ioannou I, Hafsa I, Hamdi S, Charbonnel C, Ghoul M. Review of the effects of food processing and formulation on flavonol and anthocyanin behaviour. *J Food Eng.* 2012;111(2):208–217.
299. Salinas RM, González GA, Pirovani ME, Ulín F. Modelación del deterioro de productos vegetales frescos cortados. *Univ y Cienc trópico húmedo.* 2016;23(2):196.
300. Morales Peralta FS. Cinética de degradación de polifenoles y formación de hidroximetilfurfural en extractos de vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*) sometidos a tratamientos térmicos. Universidad de Chile; 2020.
301. Gentry T, Roberts J. Formation kinetics and application of 5-hydroxymethylfurfural as a time-temperature indicator of lethality for continuous pasteurization of apple cider. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2004;5:327–333.
302. Fallico B, Arena E, Zappala M. Prediction of honey shelf life. *J Food Qual.* 2009;32:352–68.
303. Correa Mosquera AR. Evaluación de indicadores de deterioro de miel de diferentes especies de abejas. Universidad Nacional de Colombia; 2015.
304. Boonchiangma, S. Chanthai S, Srijaranai S. Chemical compositions and non-enzymatic browning compounds of Thai honey: a kinetic study. *J Food Process Eng.* 2011;34(5):1584–1596.
305. Scrob T, Varodi SM, Vintilă GA, Casoni D, Cimpiou C. Estimation of degradation kinetics of bioactive compounds in several lingonberry jams as affected by different

- sweeteners and storage conditions. *Food Chem X*. 2022;16(30):100471.
306. Wang Y, Juliani R, Simon JE, Ho C. Amino acid-dependent formation pathways of 2-acetylfuran and 2,5-dimethyl-4 hydroxy-3[2H]-furanone in the Maillard reaction. *Food Chem*. 2009;115:233–7.
  307. López Rodríguez E. Estudio de la estabilidad de miel producida en dos municipios del estado de Oaxaca, durante su almacenamiento: parámetros fisicoquímicos, perfil polifenólico y actividad antioxidante. Universidad Tecnológica de la Mixteca; 2019.
  308. Lazcano M, Oscar P, Pereira D, Ronquillo A. Determinación de propiedades termofísicas en diferentes mieles de abeja recolectadas en el Estado de Puebla. *Rev Verde Agroecol e Desenvolv Sustent*. 2012;7(4):Nota tecnica 8-15.
  309. Paravisini L, Peterson DG. Mechanisms Non-Enzymatic Browning in Orange Juice During Storage. *Food Chem*. 2019;289:320–7.
  310. Ghorab A, Rodríguez-Flores MS, Nakib R, Escuredo O, Haderbache L, Bekdouche F, et al. Sensorial, melissopalynological and physico-chemical characteristics of honey from Babors Kabylia's region (Algeria). *Foods*. 2021;10(2).
  311. Castro-Vázquez L, Gonzalez-Viñas M, Díaz-Maroto M, De la Fuente E, Pérez-Coello M. Influence of storage conditions on chemical composition and sensory properties of citrus honey. *J Agric Food Chem*. 2008;56:1999–2006.
  312. Castro-Vázquez L, Elena Alañon M, González-Viñas M., Soledad Pérez-Coello M. Changes in the volatile fractions and sensory properties of heather honey during storage under different temperatures. *Eur Food Res Technol*. 2012;235(185–193).
  313. Patrignani M, Ciappini MC, Tananaki C, Fagúndez GA, Thrasyvoulou A, Lupano CE. Correlations of sensory parameters with physicochemical characteristics of Argentinean honeys by multivariate statistical techniques. *Int J Food Sci Technol*. 2017;53(5):1176–84.
  314. Ciappini MC, Di Vito M V., Gatti MB, Calviño AM. Development of a quantitative descriptive sensory honey analysis: Application to eucalyptus and clover honeys. *Adv J Food Sci Technol*. 2013;5(7):829–38.
  315. Habryka C, Socha R, Juszczak L. Effect of bee pollen addition on the polyphenol content, antioxidant activity, and quality parameters of honey. *Antioxidants*. 2021;10(5):1–15.



316. Šedík P, Prokeřinová R, Horská E. Consumption patterns and sensory perception of honey by young segment in Slovakia. *Econ Manag Innov.* 2018;10(3):5–14.
317. Arrabal M V, Ciappini MC. Aceptabilidad de miel y su correlación con análisis fisicoquímicos. *Galeria Apic virtual.* 2000;3:1–5.
318. Ramírez Navas JS. Análisis sensorial: pruebas orientadas al consumidor. Vol. 12, *Reciteia.* 2012. 91–92 p.
319. Naczk M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A.* 2004;1054:95–111.
320. Hata T, Tazawa S, Ohta S, Rhyu MR, Misaka T, Ichihara K. Artepillin C, a major ingredient of Brazilian propolis, induces a pungent taste by activating TRPA1 channels. *PLoS One.* 2012;7(11):e48072.
321. Habryka C, Socha R, Juszczak L. The effect of enriching honey with propolis on the antioxidant activity, sensory characteristics, and quality parameters. *Molecules.* 2020;25(5):1176.
322. Ciappini MC, Gattuso S, Gatti MB, Di Vito M V, Gómez G. Determinación Palinológica, Sensorial y fisicoquímica de la Provincia de Santa Fé, (Argentina) según provincias fitogeográficas. Primera parte. *Invenio.* 2009;12(22):109–20.
323. M. C, E. S. Physicochemical and sensory analysis of honeys from eastern Formosa province (Argentina) and its relationship with their botanical origin. *Food Chem Adv.* 2022;1(March):100026.
324. Iordachescu G. From bee to plate - a sensory foray in honey world. *Bull USAMV-CN.* 2006;62:264–9.
325. Cabrera M, Santander E. Physicochemical and sensory analysis of honeys from eastern Formosa province (Argentina) and its relationship with their botanical origin. *Food Chem Adv.* 2022;1(March):100026.
326. Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. Honey for nutrition and health: A review. *J Am Coll Nutr.* 2008;27(6):677–89.
327. Kortensniemi M, Rosenvald S, Laaksonen O, Vanag A, Ollikka T, Vene K, et al. Sensory and chemical profiles of Finnish honeys of different botanical origins and consumer preferences. *Food Chem.* 2018;246:351–9.
328. Osés SM, Pascual-Maté A, Fernández-Muiño MA, López-Díaz TM, Sancho MT.

- Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chem.* 2016;196:1215–23.
329. Can Z, Yildiz O, Sahin H, Akyuz Turumtay E, Silici S, Kolayli S. An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chem.* 2015;180:133–41.
330. Kotsiou K, Tasioula-Margari M. Monitoring the phenolic compounds of Greek extra-virgin olive oils during storage. *Food Chem.* 2016;200:255–262.
331. Ciulu M, Solinas S, Floris I, Panzanelli A, Pilo MI, Piu PC, et al. RP-HPLC determination of watersoluble vitamins in honey. *Talanta.* 2011;83(3):924–9.
332. Fauzi NA, Farid MM. High pressure processed manuka honey: change in nutritional and rheological properties over 1-year storage. *J Food Process Preserv.* 2016;41(4).
333. Kallithraka S, Salacha MI, Tzourou I. Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chem.* 2009;113(2):500e505.
334. Geng Y, Liu X, Yu Y, Li W, Mou Y, Chen F, et al. From polyphenol to o-quinone: Occurrence, significance, and intervention strategies in foods and health implications. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2023;May 23.
335. Sánchez-Martín, V Morales P, González-Porto, A.V. Iriondo-DeHond A, López-Parra M., Del Castillo, M.D Hospital X., Fernández M, Hierro E, et al. Enhancement of the antioxidant capacity of thyme and chestnut honey by addition of bee products. *Foods.* 2022;11:3118.
336. Juszczak L, Gałkowska D, Ostrowska M, Socha R. Antioxidant activity of honey supplemented with bee products. *Nat Prod Res.* 2016;30(12):1436–9.
337. Brudzynski K, Miotto D. The relationship between the content of Maillard reaction-like products and bioactivity of Canadian honeys. *Food Chem.* 2011;124(3):869–74.
338. Fauzi NA, Farid MM, Silva FVM. High-pressure processing of manuka honey: improvement of antioxidant activity, preservation of colour and flow behaviour. *Food Bioprocess Technol.* 2013;7(8):2299–307.
339. Kalin P, Gulcin I, Goren AC. Antioxidant activity and polyphenol content of cranberries (*Vaccinium macrocarpon*). *Rec Nat Prod.* 2015;9:496–502.
340. Carbonell-Capella JM, Buniowska M, Barba FJ, Esteve MJ, Frígola A. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds

- from fruits and vegetables: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2014;13(2):155–71.
341. Kamiloglu S, Ayfer AA, Ozcelik A, Camp J V, Capanoglu E. Influence of different processing and storage conditions on *in vitro* bioaccessibility of polyphenols in black carrot jams and marmalades. *Food Chem.* 2015;186(1):74–82.
342. Kong F, Singh RP. A human gastric simulator (HGS) to study food digestion in human stomach. *J Food Sci.* 2010;75:627–635.
343. Tarko T, Duda-Chodak A, Zajac N. Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by *in vitro* simulation methods. A review. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2013;64:79–84.
344. Costa ED., Henrique P, Sousa M., Camurça A, Siqueira P, Altina E, et al. Fruit pastes with organic honey texturized with gellan gum: Bioaccessibility of antioxidant activity and sensory analysis fruit pastes with gellan and organic honey. *Food Sci Technol.* 2019;39(3):667–76.
345. Seraglio SKT, Schulz M, Gonzaga L V., Fett R, Costa ACO. Current status of the gastrointestinal digestion effects on honey: A comprehensive review. *Food Chem.* 2021;357:129807.
346. Shahidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods.* 2015;18:757–81.
347. Alevia M, Rasines S, Cantero L, Teresa Sancho M, Fernández-Muiño MA, Osés SM. Chemical extraction and gastrointestinal digestion of honey: Influence on its antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities. *Foods.* 2021;10(6).
348. O’Sullivan AM, O’Callaghan YC, O’Connor TP, O’Brien NM. Comparison of the antioxidant activity of commercial honeys, before and after in-vitro digestion. *Polish J Food Nutr Sci.* 2013;63(3):167–71.
349. Cianciosi D, Forbes-Hernández, T Y Afrin S, Gasparrini M, Quiles JL, Gil E, Bompadre S, et al. The influence of *in vitro* gastrointestinal digestion on the anticancer activity of manuka honey. *Antioxidants.* 2020;9:64.
350. Tagliazucchi D, Verzelloni E, Bertolini D, Conte A. *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chem.* 2010;120(2):599–606.
351. Bermúdez-Soto, M J Tomás-Barberán, F A García-Conesa MT. Stability of

- polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. Food Chem. 2007;102(3):865–74.
352. Saura-Calixto F, Serrano J, Goñi I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. Food Chem. 2007;101(2):492–501.
  353. Argyri K, Komaitis M, Kapsokefalou M. Iron decreases the antioxidant capacity of red wine under conditions of *in vitro* digestion. Food Chem. 2006;96(2):281–9.
  354. Helal A, Tagliacruzchi D, Verzelloni E, Conte A. Bioaccessibility of polyphenols and cinnamaldehyde in cinnamon beverages subjected to *in vitro* gastro-pancreatic digestion. J Funct Foods. 2014;7:506-516.
  355. Olgun F, Ozyurt D, Berker K, Demirata B, Apak R. Folin–Ciocalteu espectrophotometric assay of ascorbic acid in pharmaceutical tablets and orange juice with pH adjustment and pre-extraction of lanthanum(III)–flavonoid complexes. J Sci Food Agric Press. 2014;
  356. Castro-Alves, VC Cordenunsi B. Total soluble phenolic compounds quantification is not as simple as it seems. Food Anal Methods. 2014;8(4):873–884.
  357. Maheshwari D, Shaikh N. An overview on toxicity testing method. Int J Pharm Technol. 2016;8(2):3834–3849.
  358. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. Food Chem Toxicol. 1998;36:347–63.
  359. Samat S, Kanyan Enchang F, Nor Hussein F, Wan Ismail WI. Four-week consumption of malaysian honey reduces excess weight gain and improves obesity-related parameters in high fat diet induced obese rats. Evidence-based Complement Altern Med. 2017;2017.
  360. Rafie AZM, Syahir A, Ahmad WANW, Mustafa MZ, Mariatulqabiah AR. Supplementation of stingless bee honey from *Heterotrigona itama* improves antiobesity parameters in high-fat diet induced obese rat model. Evidence-based Complement Altern Med. 2018;2018.
  361. Gohar A, Shakeel M, Atkinson RL, Haleem DJ. Potential mechanisms of improvement in body weight, metabolic profile, and liver metabolism by honey in rats on a high fat diet. PharmaNutrition. 2020;14:100227.
  362. Yaghoobi N, Al-Waili N, Ghayour-Mobarhan G, Parizadeh SM., Abasalti Z,

- Yaghoobi Z, et al. Natural Honey and Cardiovascular Risk Factors; Effects on blood glucose, cholesterol, triacylglycerole, CRP, and body eeight compared with sucrose. *ScientificWorldJournal*. 2008;8:463–9.
363. Ponte FLR, Silva AAR, Maia MBS. Bee-honey, propolis and *Eucalyptus globulus* extract: Preclinical toxicity study in Rodents. *Pharmacogn Mag*. 2008;4(16):278–86.
  364. Giner T, Ojinaga V, Neu N, Koessler M, Cortina G. Ethylene glycol intoxication presenting with high anion gap metabolic acidosis, acute kidney injury and elevated lactate. *Pediatr Int*. 2018;60(2):194–5.
  365. Héloïse B, Jean-Philippe H. Experimental models of renal calcium stones in rodents. *World J Nephrol*. 2016;5(2):189–94.
  366. Thongboonkerd, V Mungdee S, Chiangjong W. Should urine pH be adjusted prior to gel-based proteome analysis? *J Proteome Res*. 2009;8:3206–3211.
  367. Ratkalkar VN, Kleinman JG. Mechanisms of stone formation. *Clin Rev Bone Miner*. 2011;9:187–97.
  368. Han H, Segal AM, Seifter JL, Dwyer JT. Nutritional management of kidney stones (nephrolithiasis). *Clin Nutr Res*. 2015;4:137–52.
  369. Fialová L, Vejražka M. Urine analysis II: physical examination urinary sediment general medicine. *Ústav Lékařské Biochem a Lab Diagnostiky*. 2018;10–9.
  370. Gohar A, Shakeel M, Atkinson RL, Haleem DJ. Potential mechanisms of improvement in body weight, metabolic profile, and liver metabolism by honey in rats on a high fat diet. *PharmaNutrition*. 2020;100227.
  371. Pourmoradian S, Mahdavi R, Mobasser M, Faramarzi E, Mobasser M. Effects of royal jelly supplementation on body weight and dietary intake in type 2 diabetic females. *Heal Promot Perspect*. 2012;28(2):231–5.
  372. Oršolić N, Landeka Jurčević I, Đikić D, Rogić D, Odeh D, Balta V, et al. Effect of propolis on diet-induced hyperlipidemia and atherogenic indices in mice. *Antioxidants (Basel)*. 2019;Jun 3 (8)(6):156.
  373. Zhao B, Su B, Zhang H, Liu W, Du Q, Li Y. Anti-urolithiatic effect of ferulic acid on ethylene glycol-induced renal calculus in experimental rats. *Trop J Pharm Res*. 2019;18(1):109–15.
  374. Lulat S, Yadav Y, Balaraman R, Maheshwari R. Antiurolithiatic effect of lithocare

- against ethylene glycol-induced urolithiasis in Wistar rats. *Indian J Pharmacol.* 2016;48(1):78–82.
375. Abhirama B., ShanmugaSundaram R. Antiurolithic and antioxidant activity of ethanol extract of whole-plant *Biophytum sensitivum* (Linn.) DC in ethylene-glycol-induced urolithiasis in rats. *Pharmacognosy Res.* 2021;181–7.
  376. Elghouzi A, Al-Waili N, Elmenyiy N, Elfetri S, Aboulghazi A, Al-Waili A, et al. Protective effect of bee pollen in acute kidney injury, proteinuria, and crystalluria induced by ethylene glycol ingestion in rats. *Sci Rep.* 2022;12(1):1–11.
  377. Cardinali FJ. Efecto diurético de *Cuphea glutinosa* Cham. et Schltld (Lythraceae), en ratas Wistar. *Dominguezia.* 2018;34(1):45–51.
  378. Fan S, Bai S. Urinalysis. In: *Contemporary practice in clinical chemistry.* 4ta Edición INC; 2020. p. 665–80.
  379. Cox RD, Phillips WJ. Ethylene Glycol Toxicity. *Mil Med.* 2004;169(8):660–3.
  380. American Diabetes Association (ADA). *Microvascular complications and foot care: standards of medical care in diabetes-2020.* 2020;43:S135–51.
  381. Cavanaugh C, Perazella MA. Urine sediment examination in the diagnosis and management of kidney disease: core curriculum 2019. *Am J Kidney Dis.* 2019;73(2):258–72.
  382. Hosseinzadeh H, Khooei A, Khashayarmanesh, Z Motamed-Shariaty V. Antiurolithiatic activity of *Pinus eldarica* Medw. fruits aqueous extract in rats. *Urol J.* 2010;7(4):232–7.
  383. Panigrahi PN, Dey S, Sahoo M, Dan A. Antiurolithiatic and antioxidant efficacy of *Musa paradisiaca* pseudostem on ethylene glycol-induced nephrolithiasis in rat. *Indian J Pharmacol.* 2017;49(1):77–83.
  384. Selvam R, Kalaiselvi P, Govindaraj A, Bala Murugan V, Sathish Kumar AS. Effect of *A. lanata* leaf extract and vediuppu chunnam on the urinary risk factors of calcium oxalate urolithiasis during experimental hyperoxaluria. *Pharmacol Res.* 2001;43:89–93.
  385. Wang R, Su G, Wang L, Xia Q, Liu R, Lu Q, et al. Identification and mechanism of effective components from rape (*Brassica napus* L.) bee pollen on serum uric acid level and xanthine oxidase activity. *J Funct Foods.* 2018;47:241–251.

386. Orozco R, Camaggi C. Metabolic and nutritional evaluation in nephrolithiasis. *Rev Med Clin Condes*. 2010;21(4):567–77.
387. Tabas PM, Aramjoo H, Yousefinia A, Zardast M, Abedini MR, Malekaneh M. Therapeutic and preventive effects of aqueous extract of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) pits on ethylene glycol-induced kidney calculi in rats. *Urol J*. 2021;18(6):612–7.
388. Zotta E, Ochoa F, Levy Nesmo Y, Ibarra C. El manejo de la urea y su mecanismo de adaptación durante la enfermedad renal. *Nefrol diálisis y Traspl*. 2009;29(1):35–40.
389. Farooq S, Ebrahim A, Subramhanya, KH Sakthivel R, Rajesh N, Varalakshmi P. Oxalate mediated nephronal impairment and its inhibition by c-phycoerythrin: A study on urolithic rats. *Mol Cell Biochem*. 2006;284:95-101.
390. Khan S, Joshi S, Wang W, Peck A. Regulation of macromolecular modulators of urinary stone formation by reactive oxygen species: transcriptional study in an animal model of hyperoxaluria. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2014;306(11):F1285-1295.
391. Khan S. Osteogenic changes in kidneys of hyperoxaluric rats. *Biochem Biophys Acta*. 2015;9:2000–2012.
392. Joshi S, Khan S. NADPH oxidase: a therapeutic target for hyperoxaluria-induced oxidative stress - an update. *Future Med Chem*. 2019;11(23):2975–2978.
393. Erejuwa O., Nwobodo N., Akpan JL, Okorie UA, Ezeonu C., Ezeokpo BC, et al. Nigerian honey ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in alloxan-induced diabetic rats. *Nutrients*. 2016;8(3):95.
394. Khan S, Kok D. Modulators of urinary stone formation. *Front Biosci*. 2004;9:1450–82.
395. Asuk AA. Total serum protein and albumin levels of Wistar rats on administration of methanol-ethanol (1:1) leaf extracts of *Anacardium occidentale* and *Jatropha tanjorensis*. *IDOSR J Biochem*. 2018;3(2):20–6.
396. López-Cabanillas RK, Huayanay-Conde R, Gonzales C, Maguiña M, Granados I, Ccasani M, et al. Antiurolithic activity of the ethanolic extract of Ayacuchano propolis in rats. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2017;34(4):642–8.
397. Kumawat P, Bundela R, Shukla K. Antiurolithiatic activity of *Pascopyrum smithii* in a polyherbal formulation inhibition of calcium oxalate crystallization on urolithiasis

- induced rats. *Int J Pharm Sci Med*. 2023;8(2):6–25.
398. Mahmud SA, Khdhr AR, Taha AM, Qadir HA, Abdulla PM, Chato KB. Effects of *Allium siculum* in ethylene glycol induced kidney stone in male albino rats Sarbast. *Kuwait J Sci*. 2021;48(3):1–11.
399. Efferth T, Koch E. Complex interactions between phytochemicals. The multitarget therapeutic concept of phytotherapy. *Curr Drug Targets*. 2011;12(1):122–32.
400. Ahmed S, Hasan M, Mahmood Z. Antiuro lithiatic plants: multidimensional pharmacology. *J Pharmacogn Phytochem*. 2016;5(2):4–24.
401. Zhai W, Zheng J, Yao X, Peng B, Liu M, Huang J, et al. Catechin prevents the calcium oxalate monohydrate induced renal calcium crystallization in NRK-52E cells and the ethylene glycol induced renal stone formation in rat. *BMC Complement Altern Med*. 2013;13.
402. Noorafshan A, Karbalay-Doust S, Karimi F. Diosmin reduces calcium oxalate deposition and tissue degeneration in nephrolithiasis in rats: a stereological study, 54 (4); 252–257. *Korean J Urol*. 2013;54(4):252–7.
403. Jamshed A, Jabeen Q. Pharmacological evaluation of mentha piperita against urolithiasis: an *in vitro* and *in vivo* study. *Dose-Response*. 2022;20(1):1–15.
404. Thamilselvan S, Khan S, M M. Oxalate and calcium oxalate mediated free radical toxicity in renal epithelial cells: effect of antioxidants. *Urol Res*. 2003;31:3–9.
405. Xie X, Liu H, Yang M, Zuo C, Deng Y, JM F. Ginsenoside Rb1, a panoxadiol saponin against oxidative damage and renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. *Chin J Integr Med*. 2009;15(2):133–40.
406. El-Ashmawy N, El-Bahrawy H, Ashmawy H, Khedr E. Amelioration of lithiatic injury to renal tissue by candesartan and sodium thiosulfate in a rat model of nephrolithiasis. *PLoS One*. 2021;16(5):e0251408.
407. Wu J, Muir A. Isoflavone content and its potential contribution to the antihypertensive activity in soy bean angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *J Agric Food Chem*. 2008;56(21):9899–9904.
408. Wang Y, Quan F, Cao Q, Lin Y, Yue C, Bi R, et al. Quercetin alleviates acute kidney injury by inhibiting ferroptosis. *J Adv Res*. 2020;22(28):231–243.
409. Rashid S, Sameti M, Alqarni M, Abdel Bar FM. *In vivo* investigation of the inhibitory



- effect of *Peganum harmala* L. and its major alkaloids on ethylene glycol-induced urolithiasis in rats. *J Ethnopharmacol.* 2023;Jan 10(300):115752.
410. Razzaghi-Asl N, Garrido J, Khazraei H, Borges F, Firuzi O. Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure activity relationships. *CurrMed Chem.* 2013;20(36):4436–4450.
411. Badhani B, Sharma N, Kakkar R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Adv.* 2015;5(35):27540–27557.
412. Kakkar S, Bais S. A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential. *ISRN Pharmacol.* 2014;2014:9.
413. Bhullar KS, Lassalle-Claux G, Touaibia M, Rupasinghe H V. Antihypertensive effect of caffeic acid and its analogs through dual renin–angiotensin–aldosterone system inhibition. *Eur J Pharmacol.* 2014;730:125–32.
414. Loizzo MR, Said A, Tundis R, Rashed K, Statti G., Hufner A, et al. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) by flavonoids isolated from *Ailanthus excelsa* (Roxb) (Simaroubaceae). *Phytother Res.* 2007;21(1):32–6.
415. Park MJ, Lee EK, Heo HS, Kim M., Sung B, Kim MK, et al. The anti-inflammatory effect of kaempferol in aged kidney tissues: the involvement of nuclear factor-kappaB via nuclear factor-inducing kinase/IkappaB kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Med Food.* 2009;12(2):351–358.
416. Calixto-Campos C, Carvalho TT, Hohmann MS, Pinho-Ribeiro, F.A Fattori V, Manchope MF, Zarpelon AC, et al. Vanillic acid inhibits inflammatory pain by inhibiting neutrophil recruitment, oxidative stress, cytokine production, and NFκB activation in mice. *J Nat Prod.* 2015;78(8):1799–1808.

## 12. ANEXOS

### Anexo 1. Formato de evaluación sensorial, parte 1.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Doctorado en Ciencia de los Alimentos y Salud Humana

#### Evaluación sensorial descriptiva del producto

Nombre:

Fecha:

Numero de participante:

Edad:

**Parte 1. Nivel de agrado descriptivo categorizado.** A continuación, se presenta una tabla con subcategorías para el examen visual, olfativo, gustativo y táctil, lea cuidadosamente cada apartado y asigne un puntaje para cada uno de acuerdo a su percepción y anótelo en la columna del extremo derecho.

**Tabla1. Formato perfil sensorial para la evaluación del producto a base de miel**

Examen visual	Color	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9	
	Fluidez	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9	
	Granulosidad	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9	
Examen olfativo	Calidad	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9	
	Intensidad	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9	

Anexo 2. Formato de evaluación sensorial –parte 2



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
 Doctorado en Ciencia de los Alimentos y Salud Humana

<b>Examen gustativo</b>	<b>Calidad</b>	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9	
	<b>Persistencia /Retrogusto</b>	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9	
<b>Examen táctil</b>	<b>Estructura física</b>	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9	
	<b>Viscosidad/ consistencia</b>	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9	
<b>Total</b>			

Modificado de (1).

**Comentarios (opcional):**

**Escala de valoración (total)**

Puntaje	Juicio
>78	Excelente
69-77	Óptimo
60-68	Bueno
51-59	Suficiente
42-50	No satisfactorio
33-41	Insuficiente
<32	No aceptable

**Juicio** \_\_\_\_\_

Elaborado por: M en C. Gloria Isabel Camacho Bernal

Anexo 3. Formato de evaluación sensorial, parte 3.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
 Doctorado en Ciencia de los Alimentos y Salud Humana

**Parte 2. Juicio de defectos.** Describe la presencia de defectos en cada uno de los atributos de calidad olfativa, visual, gustativa y táctil, según corresponda, basándose en los criterios de la Tabla 2.

**Tabla 2. Juicio de calidad (criterios para establecer defectos en los atributos). Defectos objetivos**

Defecto	Puntuación
Defectos ausentes	9,8, 7
Defectos apenas perceptibles	6
Defectos leves	5
Defectos presentes	4
Defectos graves	3,2,1

Criterio	Puntuación
Defectos visuales (poca homogeneidad, separación de componentes, fluidez excesiva, turbidez)	
Defectos olfativos (olor desagradable, atípicos, olor de fermentación, extraño)	
Defectos gustativos (retrogusto, notas excesivas, sabor atípico)	
Defectos táctiles (pegajosidad excesiva no agradable)	

Fuente (2)

**Parte 3. Evaluación de color (visual).** En este apartado tendrás que especificar de acuerdo a lo percibido, que color consideras que describe mejor la muestra, marcando con una "X" aquel que consideres el más adecuado.

NOTA: Deberás de basarte en las tarjetas que el investigador te proporcione.

Blanco agua \_\_\_\_\_    Extra blanco \_\_\_\_\_    Blanco \_\_\_\_\_  
 Ámbar extra claro \_\_\_\_\_    Ámbar claro \_\_\_\_\_    Ámbar \_\_\_\_\_  
 Ámbar oscuro \_\_\_\_\_

Fuente: (3)



Anexo 5. Formato de evaluación sensorial, parte 5.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
 Doctorado en Ciencia de los Alimentos y Salud Humana

**Parte 5. Evaluación descriptiva del sabor.** En esta última sección deberás describir la intensidad de cada categoría de sabor, colocando una "x" en la intensidad que la percibas, basándote en los criterios de referencia de la Tabla 4.

**Tabla 3. Evaluación descriptiva de la intensidad del sabor.**

Descriptor	Intensidad del descriptor			
	Ausente	Débil	Intermedio	Fuerte
Dulzura				
Acidez				
Salinidad				
Amargo				
Frescura				

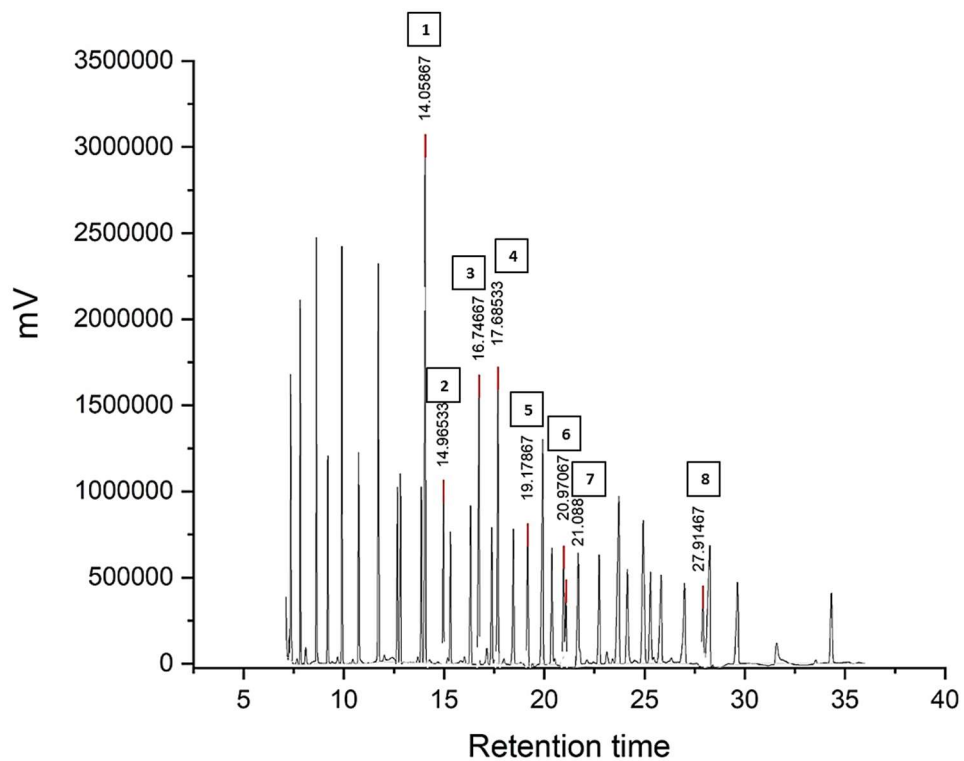
Fuente: (4,5)

**Tabla 4. Criterios de referencia para la descripción del sabor en miel**

Atributo	Referencia
Dulzura	Sensación de dulzor producido por productos que contienen azúcares (azúcar de mesa y/o fructosa).
Acidez	Sabor producido por soluciones con sustancias ácidas por ejemplo los cítricos.
Salinidad	Sensación producida por productos que contienen sales por ejemplo la sal común.
Amargo	Percepción similar al café o que productos que lo contienen.
Frescura	Sensación de frescor en la boca (similar a la que produce la menta)

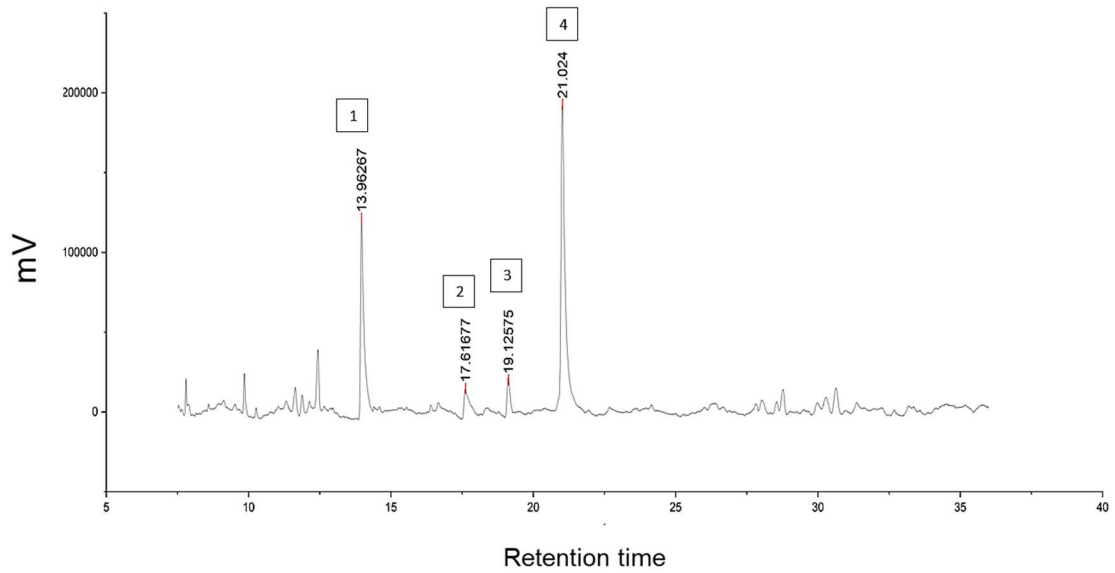
Fuente: modificado de (4,5)

## Anexo 6. Cromatograma de los estándares de los ácidos grasos



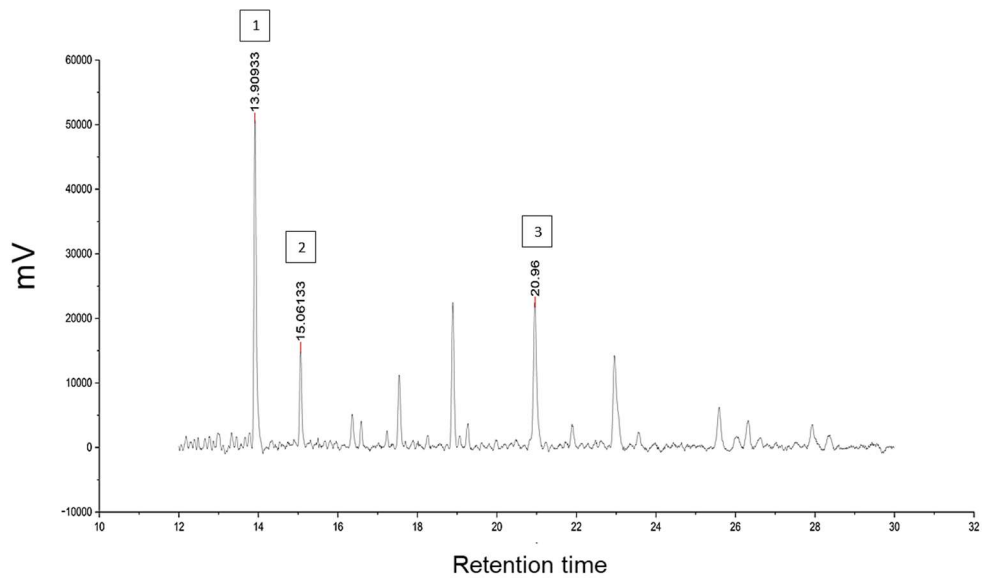
1. C16:0-ácido palmítico; 2. C16:1-ácido palmitoleico; 3. C18:0-ácido esteárico; 4. C18:1 n-9 ácido oleico. 5. C18:2 n-6 ácido linoleico; 6. C18:3 n-3 ácido linolénico; 7. C20:1- ácido cis-11 eicosenoico; 8. C22:2- ácido cis-13,16 docosadienoico

### Anexo 7. Cromatograma de los ácidos grasos en polen



Ácido palmítico; 2. Ácido oleico; 3. Ácido linoleico; 4. Ácido 11- eicosenoico.

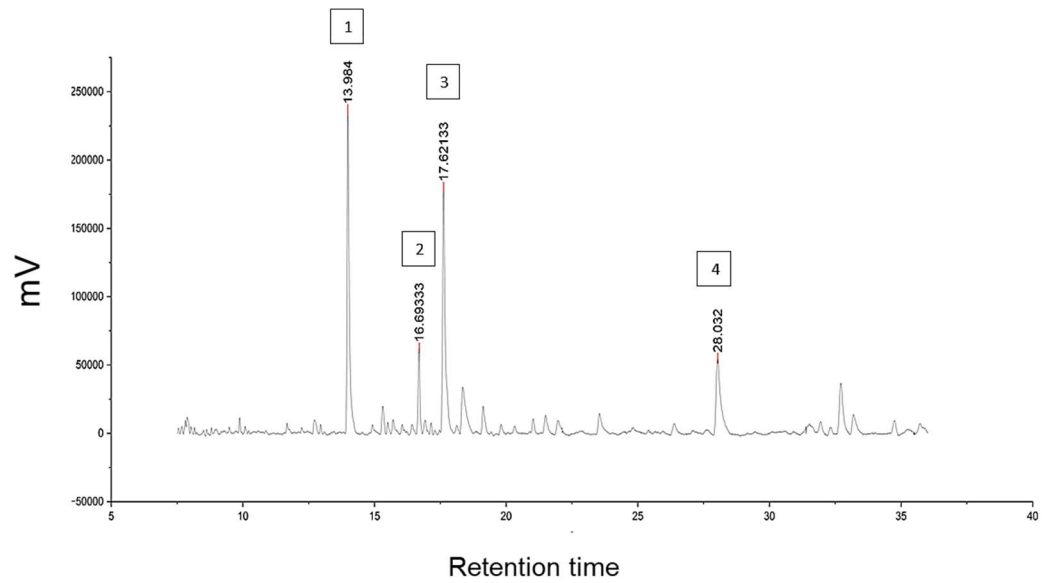
### Anexo 8. Cromatograma de los ácidos grasos en jalea real



Ácido 10-hidroxicenoico; 2. Ácido palmítico; 3. Ácido linoléico.

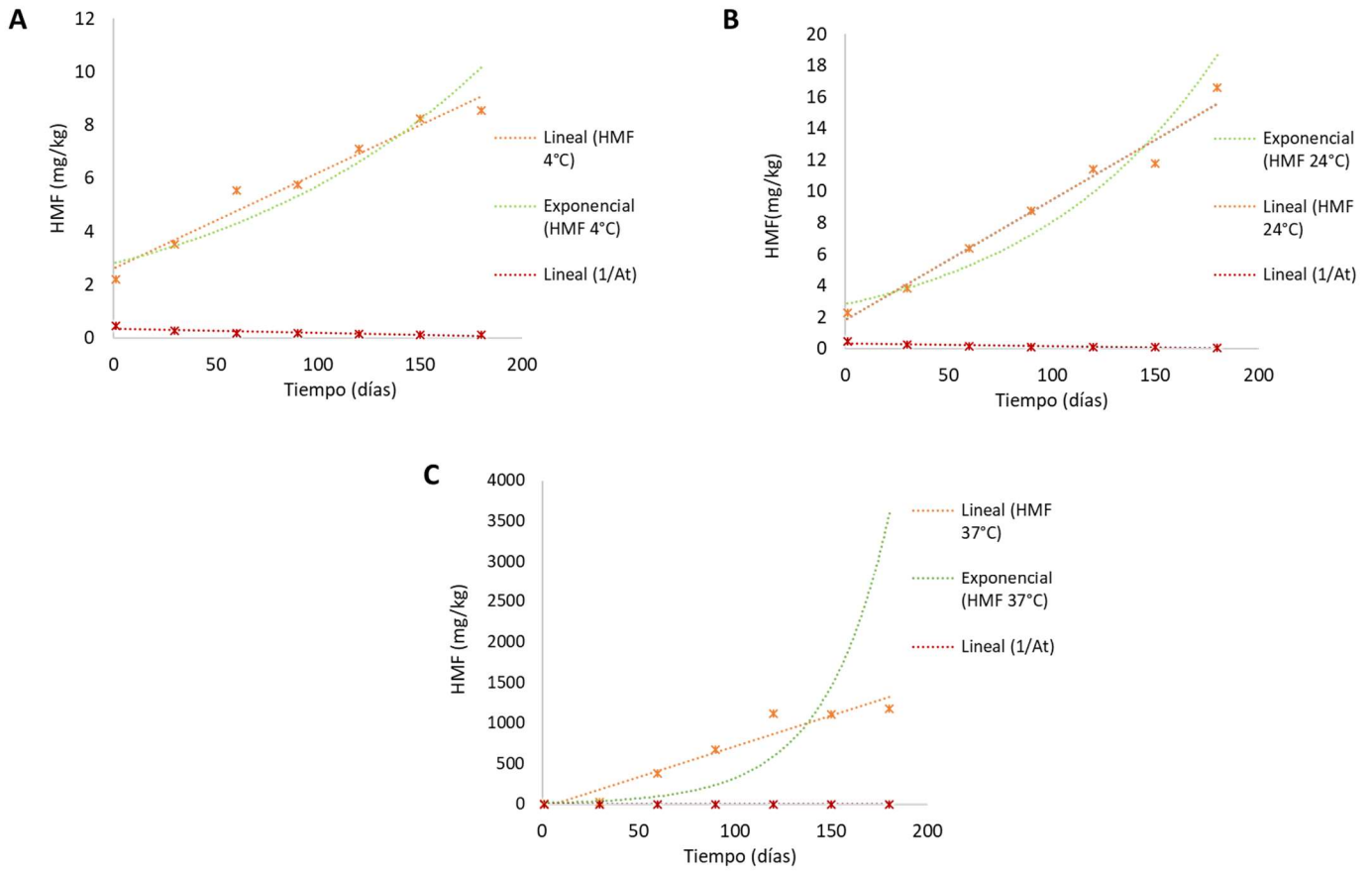


## Anexo. 9. Cromatograma de los ácidos grasos en propóleo



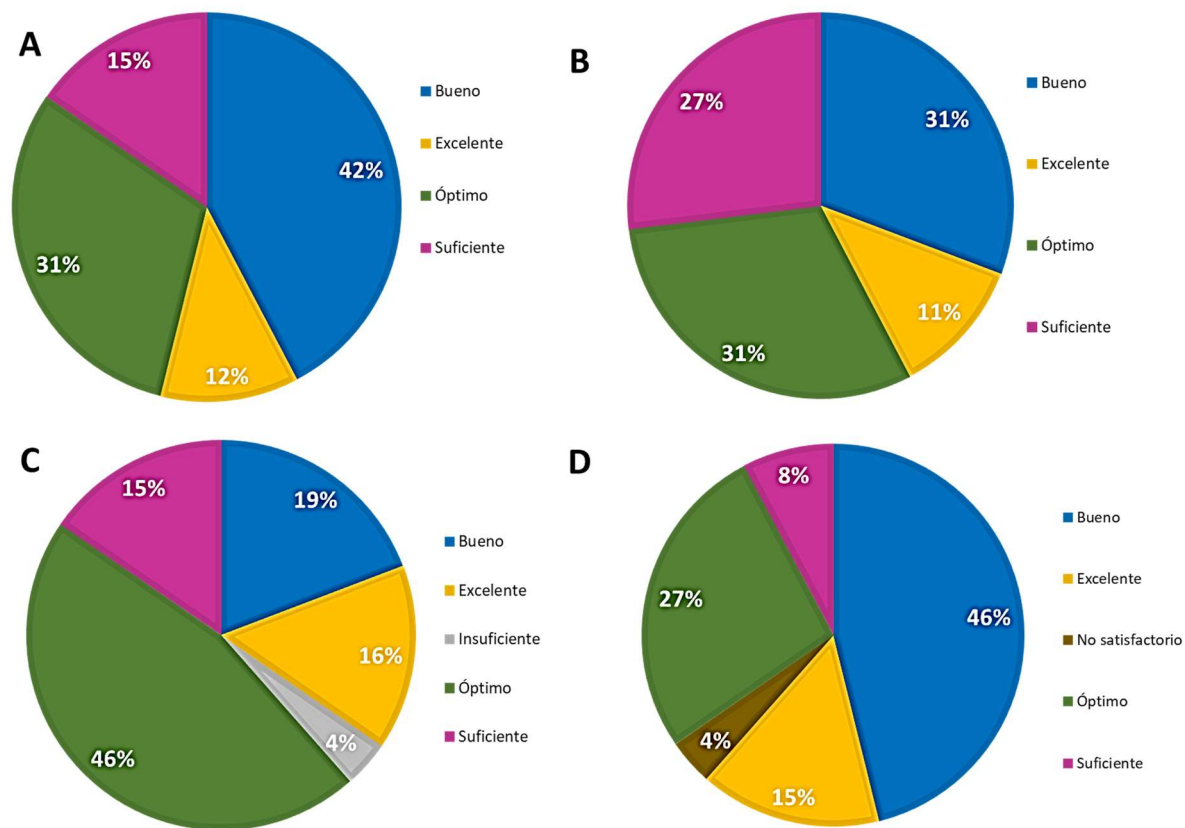
1. Ácido palmítico; 2. Estearico; 3. Ácido oleico; 4. Ácido cis-13,16 docosadienoico

Anexo 10. Linealización del contenido de HMF del alimento de diseño durante el almacenamiento a 4°C, 24°C y 37°C.



A. 4°C; B. 24°C; C. 37°C

Anexo 11. Representación gráfica del juicio general del producto días 30,60, 120 y 150



**Figura 23.** Categorías generales de aceptación (día 30,60,120 y 150). A: Día 30. B: Día 60. C: Día 120. D: Día 150