



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

# **Potencial antimicrobiano de mieles de Montes del Queguay**

**Natalia Mattos Mendoza**

Tesis de Maestría

Presentada como uno de los requisitos para el título de  
Magíster en Química

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química.  
Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Marzo, 2026

**Potencial antimicrobiano de mieles de Montes del  
Queguay**

**Tribunal:**

Dra. Caterina Rufo

Dra. Mariana Barraco

Dra. Loreley Castelli

Dra. Silvana Alborés, Directora

Dra. Gabriela Tamaño, Directora

## Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a Esther Devesa profesora de Química (Liceo I.A.V.A) por ser mi primera inspiración para ingresar en este mundo. A la Universidad del Trabajo del Uruguay que me brindó la formación como Tecnóloga Química y me dio mis primeras herramientas para trabajar “de lo que me gusta”. A la Universidad Tecnológica del Uruguay que me brindó la oportunidad seguir formándome y a la Universidad de la República por ser el lugar al que volví una y otra vez para “empezar”: hoy siento que finalmente lo logré.

A los sectores y sus personas que hicieron posible que pudiera dedicarme a este trabajo por dos años: Dirección de Investigación y Desarrollo de la UTEC, por la beca de Posgrado, a UDELAR, PEDECIBA y UTEC por la financiación del proyecto de tesis y a INIA, por otorgarme el tiempo para hacer este proceso.

Gracias a las Dras. Caterina Ruffo, Mariana Barraco y Loreley Castelli por aceptar ser parte del tribunal.

Gracias al equipo de ApiUTEc y en especial a Sandra Zapata y Selva Cora por su generosidad, acompañamiento y por compartir conocimientos con tanta apertura. Al laboratorio de Biotecnología, en particular al 14, y a cada una de las personas con las que compartí y aprendí: Belén, Sofía, Nohelly, Ana Clara, Valeria, Erika, Angie, Fernanda (y tantas más), me llevo mucho de esta convivencia diaria, gracias. Al Laboratorio de Bioactividad y Nanotecnología de Alimentos por hacerme sentir “como en casa” especialmente a Alejandra Medrano, Adriana Fernández, Jessica Báez, Victoria Olt y Matías Rodríguez. Al laboratorio de Bioquímica de Facultad de Química y al Departamento de Paleontología de Facultad de Ciencias por el apoyo y colaboración.

Asimismo, estoy profundamente agradecida a Oscar Bentancur, docente de Estadística Experimental de UTEC, quien me ha acompañado desde mi tesis de licenciatura y continúa haciéndolo con humildad y generosidad, logrando que (a veces) la estadística parezca hasta linda.

También gratitud a todas mis tutoras que fueron parte de mi camino: Lic. Andrea Ortega, Ing. Lucía Barrón, Dra. Elena Beyhaut, Mag. María Pía Grignola y hoy a mis directoras de tesis: **Dra. Gabriela Tamaño** y **Dra. Silvana Alborés**. Gracias, Gabriela, por brindarme esta oportunidad y por tus enseñanzas integrales, que trascendieron lo

académico y dejaron huella en mi forma de pensar y de trabajar. Gracias, Silvana, por aceptarme y acompañarme; por guiarme sin imponer respuestas, por invitarme a hacer preguntas y por darme el espacio para construir.

En lo personal, agradezco la contención de todos estos años como integrante del equipo de Bioinsumos de INIA a Eduardo Abreo, Federico Rivas, Caludia Barlocco, Beatriz Dini, Mariana Mortalena, Valeria Lopez y en especial a Nora Altier y Elena Beyhaut por hacerme sentir, siempre, que podía más.

Gracias a mi familia, en particular a mis padres, por ser mis raíces profundas y enseñarme que con dedicación y constancia todo se puede lograr. A la abuela Lourdes por estar siempre cuando la necesitamos. A mis amigos, que son mi familia, y en particular a Mati, por empujarme a salir de mi zona de confort e invitarme a desafiarme.

Gracias a mi compañero de vida, Mariano, por su contención y por sostenerme en cada decisión; y a mi gran maestro, el responsable de que hoy pueda alcanzar esta meta: mi hijo Lautaro, mi botón de inicio en todo esto.

*“No puedes pasar un solo día sin tener un impacto en el mundo que te rodea. Lo que haces marca la diferencia, y tienes que decidir qué tipo de diferencia quieres marcar”*

Jane Goodall

# **Potencial antimicrobiano de mieles de Montes del Queguay**

**Natalia Mattos Mendoza**

Programa de Posgrado en Química, Facultad de Química

Universidad de la República

2026

Directoras de tesis

**Dra. Silvana Alborés**

Área de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de  
Química, Universidad de la República

**Dra. Gabriela Tamaño**

Laboratorio de Tecnología de la Miel y Productos Apícolas, Departamento  
de Alimentos, Universidad Tecnológica.

Resumen

La miel es un producto natural de uso milenario, elaborado por las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) a partir del néctar floral o de secreciones de tejidos vegetales vivos, lo que da lugar, respectivamente, a mieles florales (de néctar) y a mieles de mielada. En el mercado internacional, la miel se considera un producto de alto valor agregado, particularmente cuando está diferenciada por su origen botánico, composición funcional o propiedades terapéuticas. Esto evidencia la necesidad en Uruguay de generar conocimiento sobre atributos diferenciales, especialmente en relación con su composición, origen floral y potencial bioactivo.

Al mismo tiempo, debido a la creciente resistencia antimicrobiana, se ha renovado la atención sobre productos naturales como la miel, por su capacidad para controlar microorganismos patógenos o multirresistentes a antimicrobianos. Su actividad

antimicrobiana está estrechamente vinculada a la composición química, la cual depende del origen floral, las condiciones ambientales y el manejo apícola.

En este contexto, la región de Montes del Queguay en Paysandú, representa un ambiente propicio para la producción de mieles singulares por su entorno florístico y por ser un área protegida con alta biodiversidad y bajo nivel de intervención antrópica, predominando flora nativa. En los últimos años, varios apicultores han trasladado sus colmenas a esta zona con el objetivo de producir mieles puras de monte, potencialmente distintivas por su perfil composicional y funcional. Sin embargo, estas mieles aún no han sido suficientemente estudiadas desde una perspectiva integral.

Por lo tanto, esta tesis tuvo como objetivo caracterizar mieles de Montes del Queguay en función de su origen botánico, composición fisicoquímica y actividad antimicrobiana. Los resultados mostraron que se originan principalmente a partir de flora nativa, que cumplieron con los parámetros fisicoquímicos establecidos por la normativa vigente y que presentaron actividad antimicrobiana frente a las bacterias evaluadas, además de capacidad para inhibir la formación de biofilm. Estos resultados obtenidos contribuyen a la valorización de estas mieles, al permitir explorar la relación entre actividad antimicrobiana, variables fisicoquímicas y origen botánico, y aportar evidencia que sustenta su potencial valorización comercial y posibles aplicaciones terapéuticas futuras.

Palabras claves: Miel; flora nativa; origen botánico; composición fisicoquímica; actividad antimicrobiana.

# **Antimicrobial potential of honeys from Montes del Queguay**

**Natalia Mattos Mendoza**

Graduate Program in Chemistry, School of Chemistry

Universidad de la República

2026

Advisors

**Dra. Silvana Alborés**

Área de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de  
Química, Universidad de la República

**Dra. Gabriela Tamaño**

Laboratorio de Tecnología de la Miel y Productos Apícolas, Departamento  
de Alimentos, Universidad Tecnológica.

Abstract.

Honey is a natural product with a history of use dating back millennia, produced by honeybees (*Apis mellifera* L.) from floral nectar or secretions from living plant tissues, resulting in floral (nectar) honeys and honeydew honeys, respectively. In the international market, honey is considered a high value-added product, particularly when differentiated by its botanical origin, functional composition, or therapeutic properties. This highlights the need in Uruguay to generate knowledge about its differentiating attributes, especially regarding its composition, floral origin, and bioactive potential.

At the same time, due to increasing antimicrobial resistance, attention has been renewed on natural products like honey for their ability to control pathogenic or

multidrug-resistant microorganisms. Its antimicrobial activity is closely linked to its chemical composition, which depends on its floral origin, environmental conditions, and beekeeping practices.

In this context, the Montes del Queguay region in Paysandú represents a favorable environment to produce unique honeys due to its floristic surroundings and its status as a protected area with high biodiversity and low levels of human intervention, where native flora predominates. In recent years, several beekeepers have moved their hives to this area with the aim of producing pure native woodland honeys, potentially distinctive for their compositional and functional profile. However, these honeys have not yet been sufficiently studied from a comprehensive perspective.

Therefore, this thesis aimed to characterize honeys from Montes del Queguay based on their botanical origin, physicochemical composition, and antimicrobial activity. The results showed that these honeys originate mainly from native flora, complied with the physicochemical parameters established by current regulations, and exhibited antimicrobial activity against the bacteria evaluated, in addition to showing the ability to inhibit biofilm formation. These findings contribute to the valorization of these honeys by exploring the relationship between antimicrobial activity, physicochemical variables, and botanical origin, and by providing evidence that supports their potential commercial value and possible future therapeutic applications.

Keywords: Honey; native flora; botanical origin; physicochemical composition; antimicrobial activity.

# Índice

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Generalidades, usos tradicionales y valor medicinal de la miel.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Proceso biológico de la producción de miel.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. Composición química de la miel.....</b>	<b>3</b>
1.3.1 Azúcares.....	4
1.3.2 Proteínas, péptidos y enzimas.....	5
1.3.3 Ácidos orgánicos, minerales y vitaminas.....	5
1.3.4 Compuestos fenólicos.....	7
1.3.5 Compuestos volátiles.....	9
<b>1.4. Actividad antimicrobiana de la miel: una alternativa natural frente a la resistencia a los antimicrobianos.....</b>	<b>10</b>
1.4.1 Problemática de resistencia a antimicrobianos.....	10
1.4.2 Componentes antimicrobianos de la miel.....	12
<b>1.5. Bioaccesibilidad y digestibilidad <i>in vitro</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>1.6. Aplicaciones antimicrobianas de mieles y productos derivados.....</b>	<b>21</b>
<b>1.7. Clasificación, trazabilidad y perspectivas de valorización de la miel en Uruguay.....</b>	<b>22</b>
<b>1.8. La región de Montes del Queguay como área de interés apícola.....</b>	<b>24</b>
<b>2. Objetivos de la tesis.....</b>	<b>25</b>
2.1. Objetivo general:.....	25
2.2. Objetivos específicos:.....	25
<b>3. Metodología.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1. Obtención de muestras.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2. Estudio de contenido polínico.....</b>	<b>26</b>
<b>3.3. Evaluación de características fisicoquímicas y compuestos bioactivos.....</b>	<b>27</b>
3.3.1 Determinación de parámetros fisicoquímicos.....	27
3.3.2 Determinación de compuestos fenólicos totales.....	28
3.3.3 Cuantificación de peróxido de hidrogeno.....	28
3.3.4 Análisis estadístico.....	29
<b>3.4. Actividad antimicrobiana.....</b>	<b>30</b>
3.4.1 Preparación de las suspensiones.....	30
3.4.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.....	31
3.4.3 Determinación de la Concentración Mínima Microbicida.....	31
3.4.4 Evaluación del potencial antimicrobiano de compuestos volátiles.....	32

3.4.5	Evaluación de la capacidad de inhibición de la formación de biofilms.....	33
3.4.6	Análisis estadístico.....	34
<b>3.5.</b>	<b>Evaluación de la simulación de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> en mieles .</b>	<b>35</b>
3.5.1	Metodología de la simulación gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	35
<b>4.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1.</b>	<b>Muestreo de mieles.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2.</b>	<b>Estudio de contenido polínico .....</b>	<b>41</b>
<b>4.3.</b>	<b>Evaluación de características fisicoquímicas.....</b>	<b>44</b>
<b>4.4.</b>	<b>Determinación de compuestos fenólicos totales.....</b>	<b>49</b>
<b>4.5.</b>	<b>Cuantificación de peróxido de hidrogeno .....</b>	<b>51</b>
<b>4.6.</b>	<b>Estudio de actividad antimicrobiana.....</b>	<b>55</b>
4.6.1	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Microbicida .....	55
4.6.2	Evaluación del potencial antimicrobiano de volátiles .....	61
4.6.3	Evaluación de la capacidad de inhibición de la formación de biofilms.....	61
4.6.4	Análisis de correlación entre actividad antimicrobiana y parámetros fisicoquímicos y químicos de muestras seleccionadas .....	67
<b>4.7.</b>	<b>Simulación de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .....</b>	<b>69</b>
4.7.1	Determinación de TPC en fracciones bioaccesibles.....	69
4.7.2	Actividad antimicrobiana de fracciones bioaccesibles: MIC y MMC .....	70
<b>5.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>71</b>
<b>5.1.</b>	<b>Origen botánico de las mieles.....</b>	<b>71</b>
<b>5.2.</b>	<b>Parámetros fisicoquímicos, bioactivos y digestibilidad <i>in vitro</i> .....</b>	<b>73</b>
<b>5.3.</b>	<b>Actividad antimicrobiana.....</b>	<b>78</b>
5.3.1	Influencia del año de cosecha y variabilidad fisicoquímica.....	78
5.3.2	Papel de la composición botánica .....	79
5.3.3	Comparación con mieles internacionales y miel de Manuka.....	81
5.3.4	Inhibición de formación de biofilms .....	82
5.3.5	Correlaciones entre actividad antimicrobiana y parámetros fisicoquímicos y químicos.....	84
<b>5.4.</b>	<b>Discusión general .....</b>	<b>85</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusiones y Perspectivas .....</b>	<b>87</b>
<b>7.</b>	<b>Referencias .....</b>	<b>90</b>
<b>8.</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>105</b>
<b>8.1.</b>	<b>Resultados polínicos.....</b>	<b>105</b>
<b>8.2.</b>	<b>Análisis de partición .....</b>	<b>106</b>

<b>8.3. Resultados completos del mapa de calor .....</b>	<b>114</b>
<b>8.4. Publicación derivada de esta tesis .....</b>	<b>115</b>

## Listado de tablas

**Tabla 4.1.** Identificación de las muestras de miel

**Tabla 4.2.** Resultados de los análisis fisicoquímicos

**Tabla 4.3.** Variables fisicoquímicas por grupo de clústeres

**Tabla 4.4.** Contenido de compuestos fenólicos totales

**Tabla 4.5.** TPC por grupo de clústeres y cosecha.

**Tabla 4.6.** Determinación del contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Tabla 4.7.** Concentración Inhibitoria de Biofilm Mínima

## Listado de figuras

**Figura 1.1.** Estructuras generales de compuestos fenólicos y flavonoides.

**Figura 1.2.** Estructuras químicas de ácidos fenólicos

**Figura 1.3.** Estructuras químicas de flavonoides

**Figura 1.4.** Etapas del ciclo de vida del biofilm bacteriano

**Figura 1.5.** Representación gráfica de los mecanismos responsables de la acción antibacteriana.

**Figura 1.6** Generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en miel mediada por glucosa oxidasa

**Figura 3.1.** Representación gráfica de ensayos antimicrobianos: MIC y MMC.

**Figura 3.2.** Representación del procedimiento para evaluar actividad antimicrobiana de volátiles

**Figura 3.3.** Representación gráfica de protocolo INFOGEST

**Figura 4.1.** Ubicación geográfica de los apiarios

- Figura 4.2.** Contenido polínico de cosecha 2022.
- Figura 4.3.** Contenido polínico de cosecha 2023.
- Figura 4.4.** Contenido polínico de cosecha 2024.
- Figura 4.5.** Dendrograma de agrupamiento jerárquico por composición polínica.
- Figura 4.6.** Análisis de Componentes Principales de parámetros fisicoquímicos.
- Figura 4.7.** Boxplots de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por grupos polínicos.
- Figura 4.8.** Evolución de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Figura 4.9.** Resultados de la actividad antimicrobiana de mieles cosecha 2022.
- Figura 4.10.** Resultados de la actividad antimicrobiana de mieles cosecha 2023.
- Figura 4. 11.** Resultados de la actividad antimicrobiana de mieles cosecha 2024.
- Figura 4.12.** Ensayo de inhibición de biofilms de *S. aureus*.
- Figura 4.13.** Inhibición de formación de biofilms bacterianos.
- Figura 4.14.** Inhibición de la formación de biofilms de *S.aureus*.
- Figura 4.15.** Inhibición de la formación de biofilms de *P. aeruginosa*
- Figura 4.16.** Mapa de calor de correlación entre las variables microbiológicas
- Figura 4.17.** TPC en muestras de mieles y fracciones bioaccesibles

## Listado de abreviaturas

**CIBM:** Concentración Inhibitoria de Biofilm Mínima

**DHA:** dihidroxiacetona

**EC:** conductividad eléctrica

**EROS:** especies reactivas de oxígeno

**GAE:** equivalentes de ácido gálico

**GOx:** enzima glucosa oxidasa

**HMF:** 5-hidroximetilfurfural

**IC:** efecto inhibitorio

**InBiof:** inhibición de biofilm

**MC:** efecto microbicida

**MGO:** metilglioxal

**MIC:** concentración mínima inhibitoria

**MMC:** concentración microbicida mínima

**MRSA:** *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

**PCA:** Análisis de componentes principales

**QS:** quorum sensing

**RAM:** resistencia a los antimicrobianos

**RAW:** miel cruda/sin digestión *in vitro*

**TPC:** contenido de fenoles totales

**UMF:** Unique Manuka Factor

# 1. Introducción

## 1.1. Generalidades, usos tradicionales y valor medicinal de la miel

La miel es un producto natural de uso milenario, elaborado por las abejas melíferas (*Apis mellifera L.*) a partir del néctar floral o de secreciones de tejidos vegetales vivos, lo que da lugar, respectivamente, a mieles florales (de néctar) y a mieles de mielada. En el mercado internacional, la miel se considera un producto de alto valor agregado, particularmente cuando está diferenciada por su origen botánico, composición funcional o propiedades terapéuticas. Variedades como la miel de Manuka de Nueva Zelanda o la miel de Sidr de países árabes, pueden alcanzar precios superiores a los USD 100 por kilogramo en segmentos premium (Ministry for Primary Industries, 2020 ; Uruguay XXI, 2019). Asimismo, otras mieles certificadas por su actividad biológica como la miel de Tualang de Malasia o, en un caso más cercano, la miel de Ulmo de Chile también logra posicionarse con éxito en el mercado (Azman *et al.*, 2021; Velásquez *et al.*, 2020). En contraste, Uruguay pese a ser uno de los principales exportadores comercializa su miel a granel y sin diferenciación, a un valor promedio de USD 2,28/kg (Trade Map, 2024). En 2024, más del 95 % de la producción se destinó a la exportación bajo este modelo (Pereyra, 2024), lo que evidencia la necesidad de generar conocimiento sobre atributos diferenciales, especialmente en relación con su composición, origen floral y potencial bioactivo (Tamaño & Cora, 2022; Bisang *et al.*, 2022).

Desde la antigüedad, la miel ha sido valorada no sólo como alimento, sino también como un recurso natural con propiedades medicinales reconocidas por diversas culturas del mundo. En la India, los Vedas (antiguos textos sagrados que abordan aspectos filosóficos y médicos) ya la consideraban una sustancia sagrada, asociada con el equilibrio del cuerpo y el universo. Por su parte, en el antiguo Egipto, era habitual emplear la miel en fórmulas terapéuticas, según consta en los papiros médicos de Ebers y Smith, donde se destacaban sus cualidades antisépticas y regenerativas en el tratamiento de heridas y úlceras. Además, hacia el año 5500 a. C., los egipcios fueron

pioneros en la domesticación de abejas melíferas, desarrollando la apicultura en el valle del río Nilo (Khataybeh *et al.*, 2023) .

La medicina tradicional china también la incorporó en su farmacopea: el Heji Jufang la menciona como excipiente y agente terapéutico, capaz de armonizar mezclas herbales. Por su parte, Hipócrates, en la Grecia antigua, la recomendaba para tratar afecciones digestivas y cutáneas. Estas prácticas, transmitidas durante siglos, han encontrado respaldo en la ciencia moderna demostrando que la miel posee propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y cicatrizantes, lo que confirma muchas de las aplicaciones tradicionales que aún se mantienen vigentes (Bogdanov, 2011; Nakamura *et al.*, 2003).

## **1.2. Proceso biológico de la producción de miel**

Según el Codex Alimentarius (CODEX STAN 12-1981, Rev. 2001) la miel es una sustancia dulce y natural producida por abejas melíferas a partir del néctar floral, de secreciones de partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos fitófagos presentes en ellas. Estas sustancias son recolectadas por las abejas, transformadas mediante compuestos propios, y posteriormente depositadas, deshidratadas, almacenadas y maduradas en los panales dentro de la colmena.

En una colmena típica de *Apis mellifera*, conviven tres castas: una reina (pone los huevos que darán origen a la colonia), numerosos zánganos (machos, se aparean con la reina para fertilizarla y luego mueren) y entre 30.000 y 75.000 abejas obreras. Estas últimas, todas hembras estériles, son responsables de las tareas de recolección del néctar, transformación química de la sustancia y su almacenamiento final. Las obreras adoptan distintos roles según su edad. Las abejas forrajeras, que son adultas (mayores de 21 días), salen de la colmena para recolectar néctar, polen, agua y propóleos. En cambio, las abejas nodrizas, más jóvenes (entre 5 y 15 días), permanecen dentro de la colmena encargándose de alimentar a las larvas, cuidar a la reina y procesar el néctar (Abou-Shaara, 2014).

Las abejas forrajeras recolectan néctar floral o, en determinadas condiciones, mielada, una sustancia azucarada excretada por insectos fitófagos como pulgones o cochinillas que se alimentan de la savia de las plantas (Bogdanov *et al.*, 2008). El néctar recolectado

es almacenado temporalmente en el buche melario, una estructura especializada del tracto digestivo de las abejas que permite su transporte sin ser digerido. Durante este trayecto, comienza un procesamiento enzimático inicial, en el cual las abejas incorporan enzimas como invertasa y glucosa oxidasa, producidas en sus glándulas hipofaríngeas.

Una vez de regreso a la colmena, el contenido del buche es transferido a las abejas nodrizas mediante regurgitación repetida, lo que intensifica el procesamiento enzimático y da inicio a la reducción del contenido de agua. La deshidratación es favorecida por la temperatura interna constante de la colmena (alrededor de 35 °C) y por el movimiento de las alas de las abejas, que ventilan activamente el ambiente. Como resultado, la humedad desciende a niveles inferiores al 20 % y en este punto la miel es considerada madura. Las celdas son selladas con cera, en un proceso denominado operculado, que impide la reabsorción de humedad y garantiza la conservación del producto (Berenbaum & Calla, 2021).

La recolección de miel, tradicionalmente, implicaba la destrucción del panal, lo que generaba pérdidas significativas. La invención de las colmenas de cuadros móviles por Langstroth en 1852, basada en el principio del *bee space* (un hueco preciso de aproximadamente 9.5 mm que las abejas melíferas mantienen naturalmente entre sus panales y otras superficies de la colmena), permitió extraer miel sin destruir el panal y dio origen a la apicultura moderna. Actualmente, se utilizan variantes de este modelo con tecnologías que optimizan la productividad, regulan la humedad y preservan el bienestar de las colmenas (Fels *et al.*, 2019).

### **1.3. Composición química de la miel**

La miel está compuesta por más de 200 sustancias, principalmente por azúcares, agua y otras sustancias como proteínas, enzimas, ácidos orgánicos, vitaminas, minerales, pigmentos, compuestos fenólicos, compuestos volátiles. La composición química de la miel y por consecuencia el color, aroma y sabor, están determinados fundamentalmente por la flora de origen, las condiciones geográficas y climáticas, así como también, por la salud de la abeja. Además, estos atributos pueden modificarse

según el manejo poscosecha, los métodos de procesamiento y las condiciones de su almacenamiento (Nolan *et al.*, 2019).

### 1.3.1 Azúcares

Los azúcares representan el componente principal y desempeñan un papel clave tanto en las propiedades nutricionales como en las propiedades físicas de la miel. Los monosacáridos, principalmente fructosa y glucosa, constituyen aproximadamente el 75% del contenido total de carbohidratos. Estos compuestos determinan la viscosidad, capacidad higroscópica y el patrón de cristalización del producto. El cociente fructosa/glucosa, suele ser 1,2:1 y se utiliza como indicador para predecir la tendencia de cristalización de las mieles (Da Silva *et al.*, 2016).

Además de los monosacáridos mayoritarios, la miel contiene azúcares disacáridos y trisacáridos como sacarosa, maltosa, trehalosa, melecitosa, melibiosa, rafinosa y erulosa. Entre ellos, la sacarosa y la maltosa pueden ser hidrolizadas a monosacáridos por la enzima invertasa, incorporada por las abejas a través de sus secreciones durante la conversión del néctar en miel (Ranneh *et al.*, 2021).

Durante el almacenamiento de la miel, la composición de los azúcares puede modificarse por efecto de reacciones químicas inducidas por el calor, el pH y la interacción con aminoácidos. Estas condiciones también favorecen la formación de compuestos derivados como furfural y 5-hidroximetilfurfural (Moreira *et al.*, 2010).

El 5-hidroximetilfurfural (HMF) es uno de los principales productos de degradación de azúcares presentes en la miel, generado a partir de hexosas como la glucosa y la fructosa. Su formación aumenta bajo calentamiento o almacenamiento prolongado, principalmente mediante degradación de azúcares en medio ácido y caramelización, procesos que implican deshidratación y ciclación de los azúcares con generación de compuestos tipo furano entre los que se destaca el HMF. Dado el pH naturalmente ácido de la miel, la degradación ácida de azúcares y la caramelización se consideran las vías más relevantes para su formación, por lo que el HMF se utiliza ampliamente como marcador de tratamiento térmico y/o pérdida de frescura.

Además, algunas condiciones de largo tiempo de almacenamiento y a altas temperaturas, pueden en algún caso promover el pardeamiento no enzimático por reacción entre los extremos reductores de los azúcares y los grupos amino libres de

aminoácidos como lisina, prolina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico y arginina (reacción de Maillard) (Da Silva *et al.*, 2016).

### 1.3.2 Proteínas, péptidos y enzimas

Su contenido de proteínas oscila entre el 0,2 y 0,5%, dependiendo del origen floral y geográfico de la miel. Estas proteínas, junto con los aminoácidos libres, provienen del polen, del néctar y de las secreciones glandulares de las abejas (Ranneh *et al.*, 2021).

La prolina es el aminoácido más abundante y su concentración se considera un criterio de calidad asociado al grado de maduración. El Codex Alimentarius recomienda un contenido mínimo de 180 mg/kg y, además, este parámetro puede utilizarse como indicador para la detección de adulteración. Otros aminoácidos relevantes son ácido glutámico, ácido aspártico, alanina, tirosina, leucina e isoleucina (Da Silva *et al.*, 2016; Mato *et al.*, 2006; Ordóñez *et al.*, 2005).

Dentro de la fracción proteica, se incluyen péptidos antimicrobianos, en particular la defensina-1, producida por las abejas en las glándulas hipofaríngeas y secretada en la miel durante su elaboración. Este péptido cumple un papel asociado a la inmunidad de la colmena y contribuye a la actividad antimicrobiana de la miel (Nolan *et al.*, 2019; Khataybeh *et al.*, 2023; Proaño *et al.*, 2021; Valachová *et al.*, 2016).

Además, una pequeña fracción de las proteínas está constituida por enzimas, que participan en la transformación del néctar y contribuyen a las propiedades funcionales de la miel. Entre las principales enzimas se encuentran: Invertasa, que descompone la sacarosa en glucosa y fructosa; Glucosidasas  $\alpha$  y  $\beta$ , que actúan sobre oligosacáridos; Catalasa, encargada de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno; Fosfatasa ácida, que interviene en la desfosforilación de compuestos orgánicos; Diastasas ( $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasa), responsables de degradar almidones en dextrinas y maltosa; Glucosa oxidasa, que convierte la glucosa en ácido glucónico y produce peróxido de hidrógeno. Estas enzimas son particularmente sensibles al calor y a las condiciones de almacenamiento, por lo que su actividad sirve como indicador de la calidad y frescura del producto (Da Silva *et al.*, 2016).

### 1.3.3 Ácidos orgánicos, minerales y vitaminas

Todas las mieles presentan una ligera acidez, atribuida a un contenido aproximado de 0,6 % de ácidos orgánicos, los cuales pueden estar presentes de forma natural en el

néctar o generarse durante su transformación por acción enzimática de las abejas. Entre los ácidos identificados se encuentran: aspártico, butírico, cítrico, acético, fórmico, fumárico, galacturónico, glucónico, glutámico, glioxílico, láctico, málico, oxálico, propiónico, succínico y tartárico, entre otros. El ácido glucónico es el más abundante y se produce por la oxidación de la glucosa mediante la enzima glucosa oxidasa. Estos compuestos no sólo aportan características sensoriales, sino que también influyen en parámetros de calidad como el pH, la acidez libre y la conductividad eléctrica (Mato *et al.*, 2006; Nozal *et al.*, 2003).

La acidez, además de aportar al perfil sensorial característico de la miel, cumple una función de conservante natural, ya que limita el desarrollo de microorganismos y contribuye a evitar su deterioro, favoreciendo que la miel se mantenga estable y con buenas cualidades organolépticas durante largos períodos (Brelis *et al.*, 2023).

El contenido mineral de la miel refleja la composición química de las plantas de origen y, en consecuencia, del suelo en el que crecen, ya que los minerales provienen del sustrato, son absorbidos por las raíces y luego se incorporan a la miel a través del néctar o la mielada recolectados por las abejas. Se han identificado macroelementos como potasio, magnesio, calcio, sodio y fósforo, y microelementos como hierro, zinc, cobre, manganeso, litio y cobalto, entre otros. El potasio es generalmente el elemento más abundante y representa cerca de un tercio del contenido mineral total de la miel (Da Silva *et al.*, 2016; Alqarni *et al.*, 2014). El contenido de cenizas, como indicador de calidad vinculado a la fracción mineral, se utiliza para diferenciar mieles florales de aquellas provenientes de mielada y, según el Reglamento Bromatológico Nacional, no debe superar 0,6 g/100 g en mieles florales, mientras que en miel de mielada y sus mezclas con miel de flores se admite hasta 1,2 g/100 g.

La conductividad eléctrica es un parámetro directamente relacionado con el contenido de cenizas (minerales) y la acidez, comúnmente utilizado como indicador de calidad para distinguir las mieles de origen floral a las mieles de mielada. Estas últimas presentan valores más altos de conductividad debido a su mayor contenido mineral y, por lo tanto, a una mayor concentración de iones responsables de la conducción (Escuredo *et al.*, 2013).

En cuanto a las vitaminas, su concentración en la miel es baja y corresponde principalmente a vitaminas del complejo B, aportadas por el polen en suspensión.

Entre ellas se incluyen tiamina (B1), riboflavina (B2), ácido nicotínico (B3), ácido pantoténico (B5), piridoxina (B6), biotina (B8) y ácido fólico (B9). También puede encontrarse vitamina C, aunque esta es inestable y susceptible a degradarse por efecto del calor, la luz o el oxígeno. Sumado a esta baja concentración natural, el proceso de filtrado de la miel puede reducir aún más su contenido vitamínico, debido a la eliminación casi total del polen (Da Silva *et al.*, 2016)

### 1.3.4 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios sintetizados por las plantas como mecanismo de defensa frente a condiciones de estrés biótico y abiótico, incluyendo propiedades antimicrobianas. Estas sustancias (Figura 1.1), que incluyen tanto ácidos fenólicos como flavonoides, son transferidas a la miel a través del néctar y otras secreciones vegetales recolectadas por las abejas. Los polifenoles se caracterizan por una estructura química basada en anillos aromáticos con grupos hidroxilo, cuya complejidad varía desde compuestos simples hasta polímeros de alto peso molecular (Combarros-Fuertes *et al.*, 2020; Da Silva *et al.*, 2016).

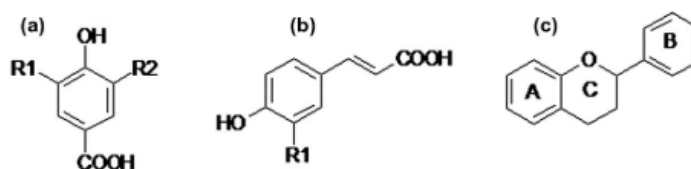


Figura 1.1. Estructuras generales de compuestos fenólicos y flavonoides. (a) ácidos hidroxibenzoicos, (b) ácidos hidroxicinámicos R1/R2 indican sustituyentes variables y (c) estructura química general de flavonoide (anillos A–C). Fuente: Da Silva *et al.*, 2016

Los ácidos fenólicos presentes en la miel se agrupan en dos grandes familias según su estructura química: los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos. Dentro del primer grupo se encuentran el ácido gálico, el ácido siríngico, el ácido benzoico, el ácido elágico y el ácido salicílico, todos derivados del ácido benzoico y caracterizados por una estructura C1–C6 (algunos ejemplos se muestran en la Figura 1.2). En el segundo grupo, los ácidos hidroxicinámicos, se incluyen compuestos como el ácido cafeico, ferúlico, cinámico, p-cumárico, junto con derivados más complejos como el ácido clorogénico y el ácido rosmarínico, que presentan una estructura C3–C6 con una cadena lateral insaturada (Da Silva *et al.*, 2016; Estevinho *et al.*, 2008).

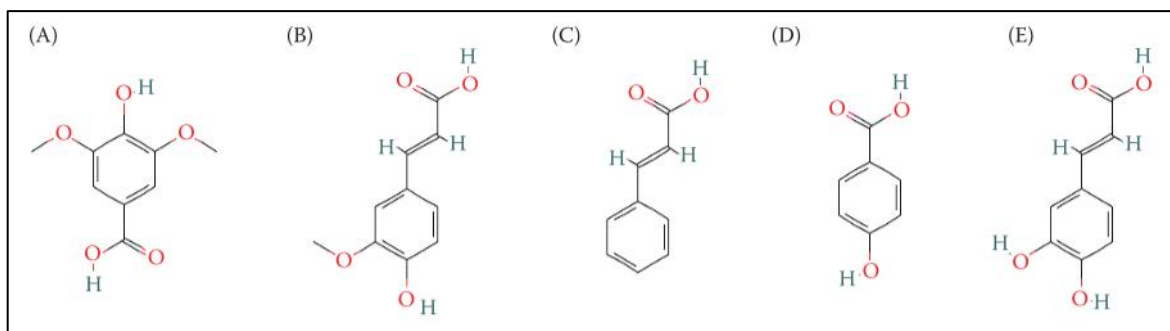


Figura 1.2. Estructuras químicas de (A) ácido siríngico, (B) ácido ferúlico, (C) ácido cinámico, (D) ácido p-hidroxibenzoico y (E) ácido cafeico. Fuente: Feknous & Boumendjel, 2022

Por otro lado, los flavonoides representan el grupo más abundante de compuestos fenólicos vegetales, abarcando más del 50 % de los compuestos fenólicos naturales (Figura 1.3.). Poseen una estructura nuclear común del tipo C6-C3-C6 y se subdividen en diferentes clases, entre las cuales destacan los flavonoles (kaempferol, quercetina, galangina y miricetina), las flavanonas (hesperidina, pinocembrina, pinobanksina), flavonas (luteolina, apigenina, acacetina, crisina) y además, otros polifenoles como los taninos (ácido elágico)(Combarros-Fuertes *et al.*, 2020; Estevinho *et al.*, 2008).

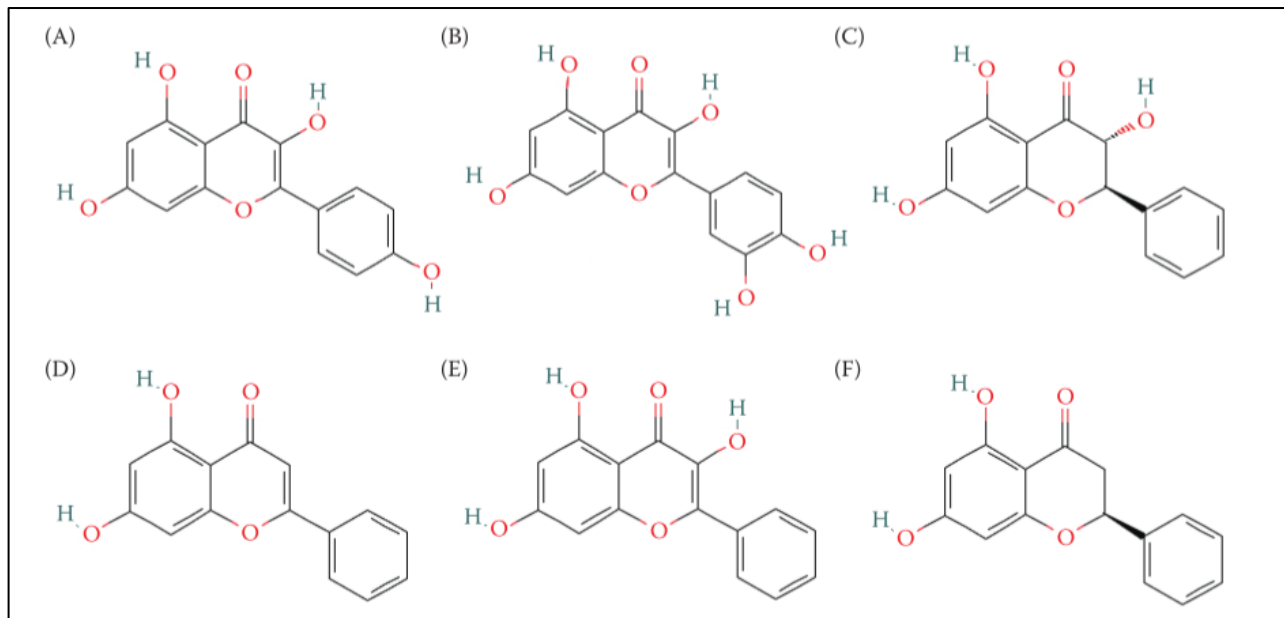


Figura 1.3. Estructuras químicas de (A) kaempferol, (B) quercetina, (C) pinobanksina, (D) crisina, (E) galangina y (F) pinocembrina. Fuente: Feknous & Boumendjel, 2022

La concentración y composición de polifenoles dependen del origen floral, geográfico y estacional, y pueden verse afectadas por el procesamiento térmico (Nolan *et al.*, 2019).

Los compuestos fenólicos han despertado un interés creciente por su capacidad antioxidante, atribuida a su habilidad para neutralizar o disminuir la formación de radicales libres, también conocidos como especies reactivas de oxígeno (EROS) (Da Silva *et al.*, 2016). Diversos estudios han demostrado una correlación positiva entre el color de la miel y la concentración tanto de compuestos fenólicos como de antioxidantes, observándose que las mieles de tonalidad más oscura presentan niveles más elevados de estos compuestos (Socha *et al.*, 2011; Bertoncej *et al.*, 2007; Gheldof & Engeseth, 2002).

### 1.3.5 Compuestos volátiles

El sabor y aroma de la miel proviene de una mezcla compleja de compuestos volátiles derivados del néctar, del metabolismo de las abejas y del procesamiento. Se han identificado más de 400 compuestos volátiles, entre ellos: terpenos, ésteres, alcoholes, ácidos grasos de cadena corta (como acético, butanoico), aldehídos y cetonas. Estos compuestos varían según el origen floral y el tiempo de almacenamiento. Algunos desaparecen con el tiempo, mientras que otros, como el etanol o compuestos derivados de linalool, pueden formarse durante el almacenamiento (Da Silva *et al.*, 2016).

Estudios previos han determinado la composición de compuestos volátiles como un posible marcador para establecer el origen botánico de las mieles (Tedesco *et al.*, 2022; Montenegro *et al.*, 2009; Castro-Vázquez *et al.*, 2006). Además, varios de estos compuestos han sido relacionados con actividad antimicrobiana (Feknous & Boumendjel, 2022).

En conjunto, los componentes químicos de la miel no sólo determinan sus propiedades fisicoquímicas y sensoriales, sino que también le confieren su actividad biológica. De hecho, estos compuestos bioactivos, reportados en mieles, han sido reconocidos por sus efectos benéficos tanto en la medicina tradicional como en la ciencia moderna (Khataybeh *et al.*, 2023).

## **1.4. Actividad antimicrobiana de la miel: una alternativa natural frente a la resistencia a los antimicrobianos.**

### **1.4.1 Problemática de resistencia a antimicrobianos**

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) representa una amenaza global que afecta no solo a la salud humana, sino también a animales, alimentos, agua y ecosistemas. Esta resistencia es un fenómeno natural, pero se ve acelerado por el uso excesivo e inapropiado de antibióticos. Algunas bacterias, como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, son responsables de un número significativo de infecciones, lo que conlleva tasas elevadas de morbilidad y mortalidad. La amplia presencia de estos microorganismos, sumada al uso excesivo e inapropiado de antibióticos, ha acelerado el desarrollo de resistencia antimicrobiana en estos patógenos (Mudenda *et al.*, 2023).

Según informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), tres de las diez principales causas de muerte a nivel mundial son enfermedades infecciosas, responsables de aproximadamente seis millones de fallecimientos por año (World Health Organization, 2024). Asimismo, se estima que en 2050 habrá 1,91 millones de muertes anuales atribuibles a la RAM a nivel mundial y 8,22 millones de muertes anuales asociadas con la RAM, siendo esta proporción total de muertes superior a las causadas por cáncer y las víctimas de accidentes de tránsito (Organización Panamericana de la Salud, 2023; Naghavi *et al.*, 2024). Además, investigaciones recientes indican que aproximadamente un tercio de los antimicrobianos en desarrollo podrían no ser suficientes para contrarrestar la rápida aparición de resistencia, y que muy pocos de estos fármacos presentan mecanismos de acción verdaderamente innovadores (Pandey *et al.*, 2021).

Las infecciones fúngicas también constituyen un problema importante de salud pública. Se estima que, una cuarta parte de la población mundial padece infecciones cutáneas por hongos. *Candida albicans*, uno de los principales patógenos fúngicos en humanos, afecta especialmente a individuos inmunocomprometidos (World Health Organization, 2022). Actualmente, solo existen cuatro clases principales de fármacos antifúngicos en uso: los azoles, equinocandinas, pirimidinas y polienos, con escasas opciones nuevas en desarrollo. Debido a que tanto las células fúngicas como las humanas son eucariotas, los tratamientos antifúngicos suelen tener efectos adversos

considerables. Por esta razón, dichos medicamentos se diseñan para actuar sobre estructuras exclusivas de los hongos, como el ergosterol en la membrana celular y los glucanos en la pared celular. A estos problemas se suma la capacidad de formar biofilms de algunos microorganismos como *C. albicans* (Raffaelli *et al.*, 2022).

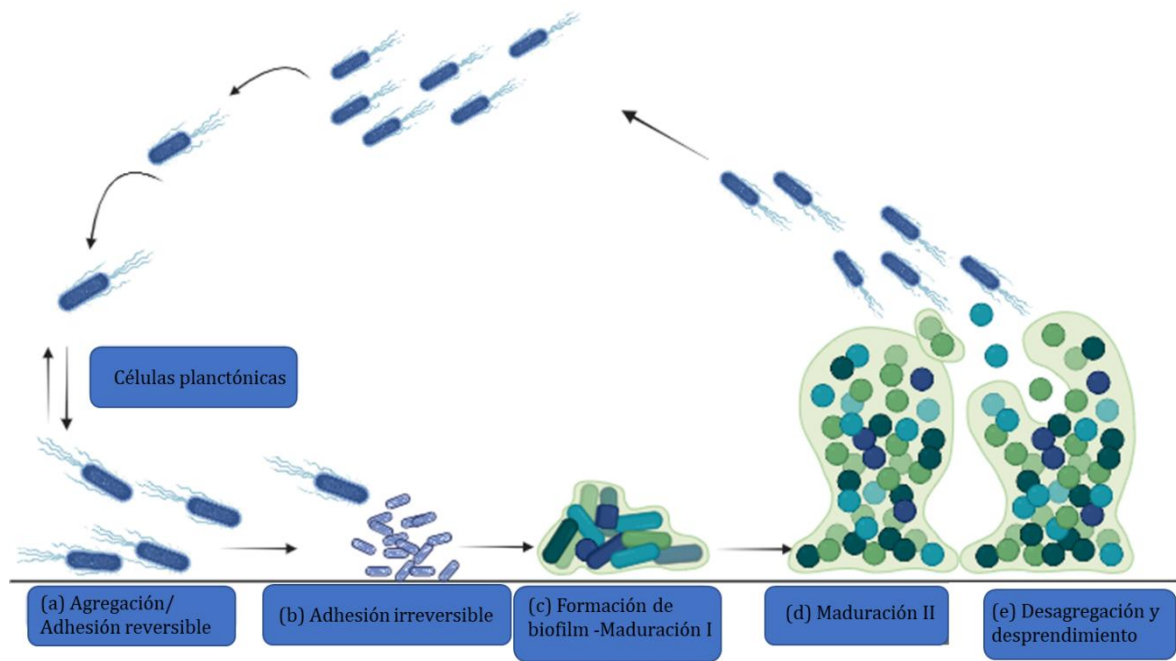


Figura 1.4. Etapas del ciclo de vida del biofilm bacteriano. Las células planctónicas se agregan y se adhieren de forma reversible a una superficie (a) establecen una adhesión irreversible (b), dando inicio a la formación de microcolonias (c), seguida de la maduración del biofilm (d) y la desagregación y desprendimiento de células para la dispersión y colonización de nuevos sitios (e). Creado con BioRender.com.

Los biofilms microbianos se encuentran dentro de las formas o mecanismos más complejos de resistencia. Un biofilm es una comunidad estructurada de microorganismos que se pueden adherir a tejidos vivos o materiales inertes y están embebidos en una matriz extracelular polimérica que ellos mismos producen (Figura 1.4). Esta estructura compleja proporciona un entorno estable para el crecimiento y supervivencia de las células microbianas, otorgándoles ventajas adaptativas frente a condiciones adversas, incluidas la respuesta inmune del huésped y la acción de los antimicrobianos (Sharma *et al.*, 2023; Nadar *et al.*, 2022). Desde el punto de vista clínico, los biofilms son altamente relevantes porque se asocian a infecciones persistentes y crónicas y contribuyen significativamente a la resistencia antimicrobiana. Se estima que hasta un 70 % de las infecciones bacterianas humanas están relacionadas con biofilms, incluyendo aquellas asociadas a dispositivos médicos

como catéteres, prótesis articulares, válvulas cardíacas y lentes de contacto. Las bacterias en estado sésil dentro del biofilm pueden ser entre 10 y 1000 veces más resistentes a los antibióticos en comparación con su forma planctónica, lo que complica el tratamiento y favorece recaídas (Sharma *et al.*, 2023; Nadar *et al.*, 2022). Las bacterias más comúnmente asociadas con la formación de biofilms incluyen *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus viridans*, *S. aureus* y *Enterococcus faecalis* (Sharma *et al.*, 2023) y en cuanto a las levaduras, las infecciones más comunes se producen por biofilms de especies de *Candida* (Cavalheiro & Teixeira, 2018).

En respuesta a estas problemáticas, desde hace años, la OMS, la FAO y la Organización Mundial de Sanidad Animal trabajan de forma conjunta para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos (RAM), incorporándose desde 2021 el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (FAO-UNEP-WHO, 2022). Estas acciones se enmarcan en el enfoque Una Salud, entendido como una estrategia integrada que busca equilibrar sosteniblemente la salud humana, animal, vegetal y ambiental (Altier & Abreo, 2020), reconociendo su interdependencia y promoviendo el trabajo interdisciplinario para proteger ecosistemas, garantizar alimentos seguros y afrontar desafíos como el cambio climático. En este marco global, se impulsan medidas como el uso responsable de antimicrobianos, el desarrollo de nuevas moléculas, la generación y difusión de conocimiento, y la actualización de políticas y regulaciones. Uruguay participa en este esfuerzo internacional a través del proyecto “Trabajando juntos para combatir la RAM”, del que derivó el Plan Nacional contra la Resistencia Antimicrobiana 2024–2028.

#### 1.4.2 Componentes antimicrobianos de la miel

La búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas antimicrobianas ha impulsado el interés por compuestos y recursos empleados antes de la era antibiótica. Entre ellos, la miel ha adquirido protagonismo gracias a sus destacadas propiedades antimicrobianas (Combarros-Fuertes *et al.*, 2020; Chidozie & Chibueze, 2025). Desde el estudio de Molan (1992), que describió su acción frente a microorganismos, las investigaciones en este campo se han intensificado y ampliado (Fernandes *et al.*, 2021; Kunat-Budzyńska *et al.*, 2023; Velásquez *et al.*, 2020; Bucekova *et al.*, 2019; Alvarez-Suarez *et al.*, 2010; Estevinho *et al.*, 2008). Además de su potencial antimicrobiano frente a

células planctónicas, la miel ha emergido como un agente natural con capacidad para inhibir tanto la formación como la viabilidad de biofilms bacterianos y fúngicos. En este contexto, la actividad antibiofilm de la miel ha sido demostrada frente a una amplia gama de microorganismos clínicamente relevantes, incluyendo bacterias Gram positivas como *S. aureus* (incluyendo cepas MRSA), *S. pneumoniae*, y Gram negativas como *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Haemophilus* spp. (Bazaid *et al.*, 2022; Farkas *et al.*, 2022; Balázs *et al.*, 2021). Asimismo, ciertas mieles monoflorales brasileñas, como la de *Astronium urundeuva* (Aroeira), han demostrado inhibir de forma significativa la formación y viabilidad de biofilms maduros de *Candida* spp., reducir la adhesión de *C. albicans* en catéteres, y potenciar la eficacia de antifúngicos azólicos, incluso frente a cepas resistentes (Lima *et al.*, 2022).

Sin embargo, los mecanismos o compuestos precisos por los cuales ejerce esta actividad antimicrobiana aún no han sido completamente esclarecidos. Se han propuesto posibles mecanismos antibacterianos (Figura 1.5) que suelen distinguir entre la contribución del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y otros factores no peroxídicos, atribuibles a la baja actividad de agua ( $a_w$ ), el pH ácido y la alta osmolaridad, así como a compuestos fenólicos, metilglioxal, compuestos volátiles, entre otros (Osés *et al.*, 2024, Machado *et al.*, 2025).

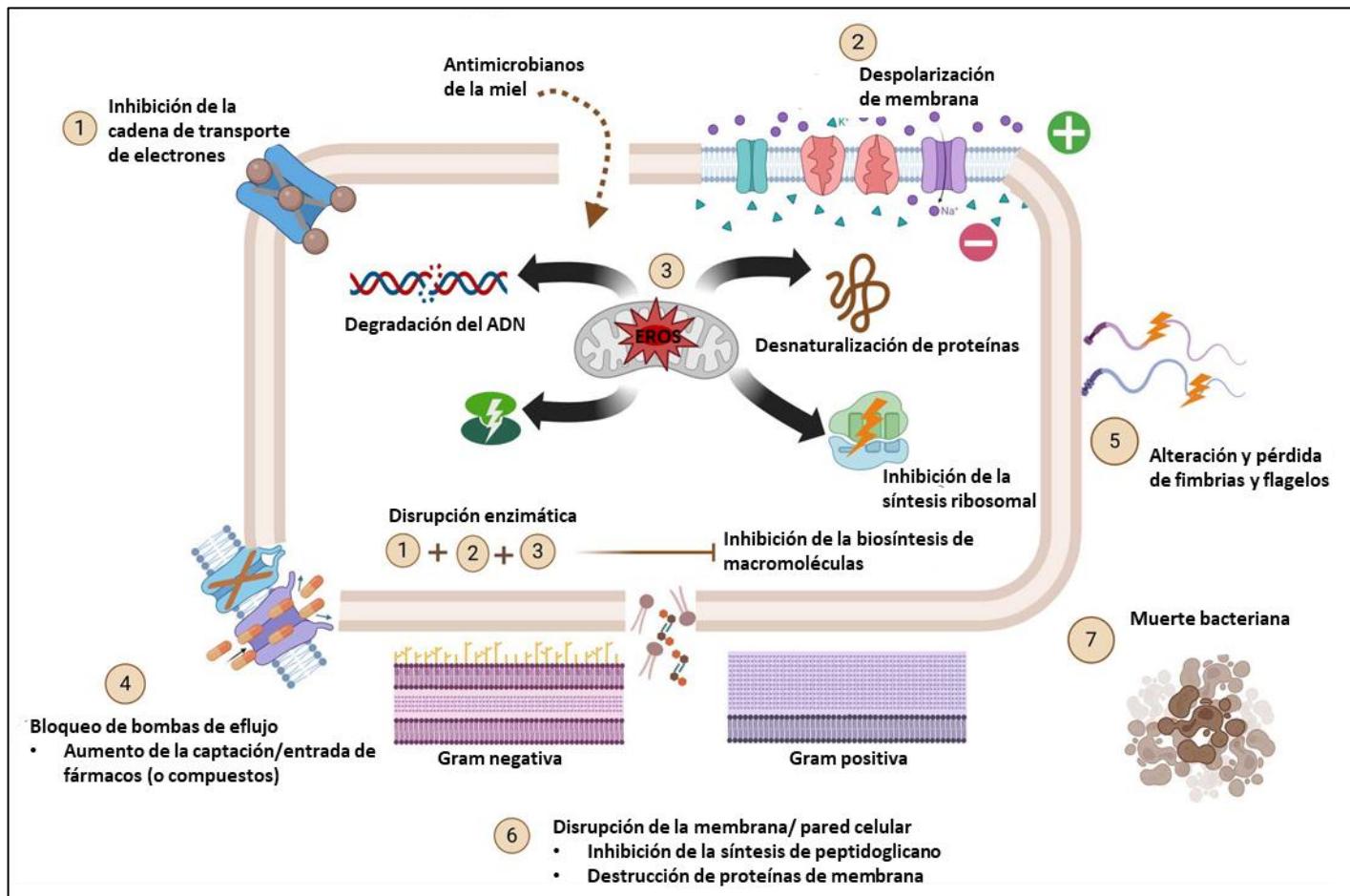


Figura 1.5. Representación esquemática de los posibles mecanismos de la acción antibacteriana de la miel frente a bacterias: (1–2) MGO y compuestos fenólicos aumentan la permeabilidad, despolarizan la membrana e inhiben la cadena de transporte de electrones. (3) Inducen EROS contribuyendo a la inhibición de la síntesis de macromoléculas. (4) Favorecen la entrada de fármacos e inhiben bombas de eflujo por colapso del potencial de membrana. (5) El MGO reduce la motilidad e interfiere con la síntesis de flagelos. (6) Fenoles, MGO y defensina de abeja alteran pared y membrana al inhibir síntesis de peptidoglicano y proteínas de membrana. (7) Lisis y muerte bacteriana. Adaptada de Aleixo *et al.*, 2025.

#### 1.4.2.1 Propiedades fisicoquímicas

Las propiedades fisicoquímicas de la miel desempeñan un papel fundamental en la actividad antimicrobiana. Su pH, que oscila entre 3,2 y 4,5, crea un ambiente desfavorable para el crecimiento microbiano. Al mismo tiempo, el alto contenido de carbohidratos y la baja humedad relativa reducen la actividad de agua ( $a_w = 0,5-0,65$ ), provocando un intenso estrés osmótico que induce la salida de agua de las células microbianas e inhibe su crecimiento (Nolan *et al.*, 2019; Combarros-Fuertes *et al.*, 2020). No obstante, estas condiciones fisicoquímicas no explican por completo la actividad antimicrobiana. Estudios comparativos con mieles artificiales, formuladas con azúcares en concentraciones similares a las naturales, han demostrado que el contenido de carbohidratos no es suficiente por sí solo para justificar este efecto (Yu *et*

*al.*, 2024; Jiang *et al.*, 2022; Nassar *et al.*, 2012; Brudzynski *et al.*, 2011). En este contexto, cobran relevancia otros compuestos minoritarios presentes en la miel, como los compuestos fenólicos, el peróxido de hidrogeno y el metilglioxal.

#### 1.4.2.2 Compuestos fenólicos totales

Además de su papel antioxidante, los compuestos fenólicos, ejercen efectos antimicrobianos. Los grupos hidroxilo de su estructura tienen la capacidad de interactuar con los componentes de las membranas celulares, generando alteraciones en fosfolípidos y proteínas. Este daño compromete la integridad de la membrana, aumenta su permeabilidad y favorece la pérdida de contenido intracelular (Khataybeh *et al.*, 2023).

Estudios han demostrado la capacidad antimicrobiana de compuestos fenólicos de la miel: flavonoides presentes en mieles italianas mostraron actividad frente a *C. albicans* (Candiracci *et al.*, 2011), así como extractos fenólicos de mieles portuguesas frente a *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumoniae* (Estevinho *et al.*, 2008) y extractos de mieles monoflorales de Ulmo inhibieron el crecimiento de *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* y *E. coli* (Velásquez *et al.*, 2020).

En cuanto a la actividad antibiofilm de la miel, se ha reportado como uno de los posibles mecanismos la interferencia del sistema de *quorum sensing* (QS), el cual regula procesos clave como la adhesión celular, la formación de biofilms y la producción de factores de virulencia. Diversos compuestos fenólicos, incluidos el ácido cafeico, ferúlico y p-cumárico, así como flavonoides como la quercetina y la pinocembrina, presentes en la miel, han mostrado capacidad para modular las señales de QS, disminuyendo la expresión de genes asociados con la motilidad bacteriana y la síntesis de biopolímeros extracelulares (Khataybeh *et al.*, 2023). Este efecto ha sido particularmente descrito en *P. aeruginosa*, donde se observó no solo una disminución en la producción de flagelina y en la capacidad de formar biofilms maduros, sino también una reducción de la motilidad natatoria (*swimming*) y en enjambre (*swarming*), asociada con la pérdida parcial de flagelos y la represión de genes clave del regulón flagelar (Roberts *et al.*, 2015).

Por otro lado, cabe destacar que, en determinadas condiciones, como en presencia de metales de transición y oxígeno, algunos flavonoides pueden actuar como prooxidantes, generando EROS mediante reacciones tipo Fenton, lo que contribuye a

su acción antimicrobiana (Khataybeh *et al.*, 2023). En este sentido, la combinación de polifenoles, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y trazas de metales de transición puede potenciar la generación de radicales hidroxilos (Brudzynski *et al.*, 2012).

#### 1.4.2.3 Producción de peróxido de hidrogeno

El peróxido de hidrógeno es considerado uno de los principales responsables de la actividad antimicrobiana de la miel. Desde los primeros estudios en la década del 60, se utilizó el término “*inhibine*” para describir la fracción antibacteriana de la miel. Investigaciones posteriores demostraron que este efecto estaba asociado en gran medida a la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Brudzynski, 2020; Molan, 1992).

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ejerce su actividad antimicrobiana a través de la producción de EROS, que promueven la peroxidación lipídica en membranas, alteraciones estructurales en proteínas y daño oxidativo en el ADN (Albaridi, 2019). En bacterias, estas lesiones generan pérdida de integridad de la membrana, inhibición de enzimas esenciales y, en última instancia, muerte celular. Su efecto es particularmente relevante porque, a diferencia de otros mecanismos de acción más específicos, la generación de estrés oxidativo afecta de manera simultánea múltiples dianas biológicas, reduciendo la probabilidad de que los microorganismos desarrollen resistencia (Brudzynski, 2020).

La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la miel varía ampliamente entre diferentes orígenes florales y condiciones de almacenamiento. En general, las concentraciones detectadas oscilan en el rango de 0,5 a 2,5 mM, lo que equivale a niveles suficientes para ejercer una acción bacteriostática o bactericida, sin alcanzar la citotoxicidad observada en tejidos humanos (Kwakman *et al.*, 2010). Sin embargo, este equilibrio depende de factores intrínsecos de la miel, como la presencia de catalasa proveniente del polen, antioxidantes como el ácido ascórbico, y el contenido fenólico, que pueden modular la cantidad final de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disponible (Osés *et al.*, 2024).

Actualmente, se reconocen dos vías principales de generación de peróxidos en la miel: la acción enzimática de la glucosa oxidasa secretada por las abejas y procesos no enzimáticos asociados a la autooxidación de compuestos fenólicos en presencia de oxígeno y metales de transición (Brudzynski, 2020; Combarros-Fuertes *et al.*, 2020).

La vía enzimática constituye la principal fuente de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la miel. Se genera cuando la enzima glucosa oxidasa (GOx), secretada por las abejas en sus

glándulas hipofaríngeas durante la recolección del néctar, cataliza la oxidación de la glucosa a  $\delta$ -gluconolactona, produciendo simultáneamente  $H_2O_2$  en presencia de oxígeno y agua (Figura 1.6). Esta reacción se basa en un ciclo redox mediado por el cofactor FAD/FADH<sub>2</sub>, donde el oxígeno actúa como aceptor final de electrones. Además, en presencia de metales de transición, el  $H_2O_2$  puede dar lugar a EROS, promoviendo procesos oxidativos que contribuyen al daño microbiano.

La catalasa, de origen polínico, hidroliza el  $H_2O_2$  a agua y oxígeno, modulando así su concentración (Feknous & Boumendjel, 2022; Osés *et al.*, 2024). La actividad de la GOx es muy limitada en la miel no diluida debido a la baja humedad y a la elevada osmolaridad, que restringen la movilidad de oxígeno y sustratos; sin embargo, se reactiva tras la dilución de la miel, condición que favorece la acción enzimática. Se ha observado que a diluciones entre 15 y 50 %, la reacción enzimática se optimiza y se alcanza el máximo de concentración de  $H_2O_2$ . A partir de ese punto, diluciones mayores vuelven a reducir la producción, configurando un patrón característico en forma de “U invertida” (Brudzynski, 2020). Diversos factores afectan la producción enzimática de  $H_2O_2$ , entre ellos: (i) la edad y función de las abejas: las nodrizas jóvenes secretan mayores cantidades de GOx que las forrajeras adultas ; (ii) el origen floral: el contenido polínico determina la concentración de catalasa y antioxidantes que modulan la disponibilidad de  $H_2O_2$ ; y (iii) las condiciones de almacenamiento y procesamiento, ya que el calor, la luz y la exposición prolongada pueden inactivar la enzima y disminuir la generación de  $H_2O_2$  (Brudzynski, 2020).

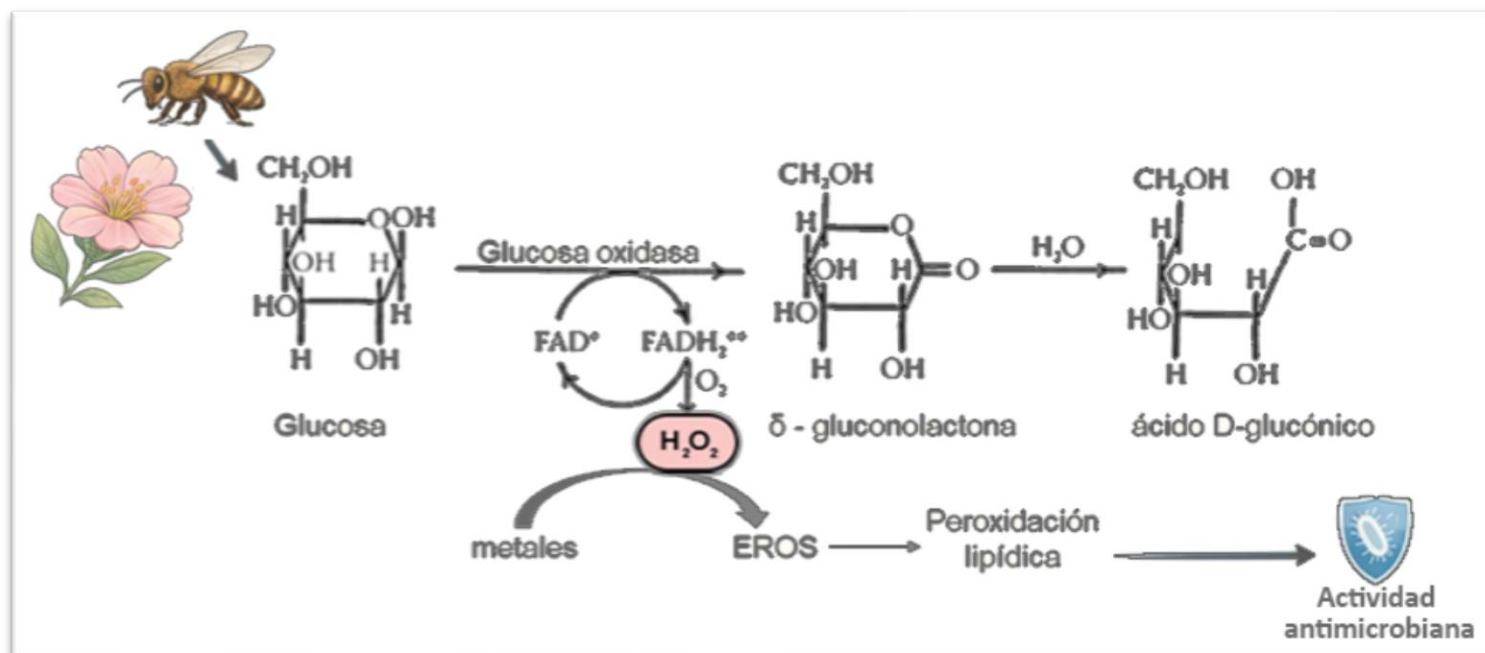


Figura 1.6. Generación de  $H_2O_2$  en miel diluida por glucosa oxidasa (GOx). Oxidación de β-D-glucosa a δ-gluconolactona/ácido D-gluconico y formación de  $H_2O_2$ . En presencia de metales,  $H_2O_2$  puede originar EROS y procesos oxidativos que contribuyen al daño microbiano. Basado en (Feknous & Boumendjel, 2022; Lehmann *et al.*, 2019).

Cabe destacar que estudios recientes no han encontrado una correlación clara entre la concentración de  $H_2O_2$  y la actividad de GOx o de catalasa (Osés *et al.*, 2024; Strelec *et al.*, 2018), observándose que la actividad antimicrobiana también depende de factores no peróxidos, como los polifenoles, flavonoides, la acidez y la baja actividad de agua.

En este sentido, se ha descrito que las mieles oscuras, con mayor contenido fenólico, presentan mayor actividad antimicrobiana que las mieles claras (Brudzynski, 2023). En la vía de producción de  $H_2O_2$  no enzimática intervienen principalmente los compuestos fenólicos de la miel. Diversos flavonoides y ácidos fenólicos pueden experimentar autooxidación en presencia de oxígeno, liberando electrones que reducen al  $O_2$  y generan  $H_2O_2$ . Este fenómeno se potencia en mieles oscuras, ricas en polifenoles, lo que explica su mayor capacidad antimicrobiana respecto a mieles claras (Brudzynski, 2023). En particular, compuestos como la quercetina, la pinocembrina y el ácido cafeico han mostrado actividad prooxidante bajo determinadas condiciones, produciendo  $H_2O_2$  y favoreciendo la generación de radicales hidroxilo ( $\bullet OH$ ) mediante la reacción de Fenton ( $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH\bullet + OH^- + Fe^{3+}$ ). Estos radicales poseen una reactividad muy elevada y son capaces de inducir lesiones irreversibles en los distintos componentes celulares de los microorganismos, incluyendo membranas, proteínas y

material genético (Khataybeh *et al.*, 2023). La generación por esta vía depende de diversos factores: el contenido y tipo de polifenoles, la presencia de metales de transición ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ), el pH y la exposición a oxígeno. Así, el sistema no enzimático complementa al enzimático, aportando una fuente alternativa y dinámica de peróxido de hidrógeno que contribuye a la acción antimicrobiana de la miel (Brudzynski, 2020).

Por lo tanto, la concentración final de  $\text{H}_2\text{O}_2$  es el resultado del equilibrio entre su producción por GOx y su degradación por catalasa, además de la influencia de compuestos antioxidantes como el ácido ascórbico o de polifenoles (Brudzynski, 2020).

#### 1.4.2.4 Metilglioxal

El metilglioxal (MGO) se origina principalmente de la deshidratación no enzimática de la dihidroxiacetona derivada del néctar del arbusto *Leptospermum scoparium* (Manuka). El MGO ( $\text{CH}_3\text{-CO-CH=O}$ ,  $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$ ) es un compuesto orgánico presente en concentraciones particularmente elevadas en la miel de Manuka, alcanzando valores cercanos a los 828 mg/kg, mientras que, en otras variedades de miel, la concentración de este compuesto es considerablemente más bajas, en torno a los 24 mg/kg (Nolan *et al.*, 2019). La miel de Manuka junto al MGO han sido ampliamente estudiados por sus propiedades terapéuticas (Kaźmierczak-Barańska & Karwowski, 2024; Mokhtar *et al.*, 2020; Sindi *et al.*, 2019; Johnston *et al.*, 2018; Cokcetin *et al.*, 2016; Visavadia *et al.*, 2008; Lusby *et al.*, 2005; Cooper *et al.*, 1999). En este contexto, la miel de Manuka certificada bajo el sistema UMF® (Unique Manuka Factor) posee especial relevancia, ya que este sello avalado por la UMF Honey Association de Nueva Zelanda garantiza su autenticidad, origen botánico y calidad bioactiva. El índice UMF cuantifica la actividad antimicrobiana no peróxidica característica de la miel de Manuka y se correlaciona con la presencia de compuestos marcadores como metilglioxal (MGO), dihidroxiacetona (DHA) y leptosperina. Así, niveles elevados como UMF 20+ indican una concentración sustancialmente mayor de estos componentes, lo que se asocia con una potencia antibacteriana superior y convierte a este tipo de miel en un modelo de referencia para investigaciones sobre bioproductos antimicrobianos naturales (Girma *et al.*, 2019; Gruznov *et al.*, 2024)

El MGO es capaz de alterar la morfología de las bacterias, interferir con su división celular, despolarizar sus membranas y favorecer la lisis celular, además de inhibir la formación de biofilms (Combarros-Fuertes *et al.*, 2020; Nolan *et al.*, 2019).

Estudios *in vitro* han demostrado que la miel de Manuka, gracias a su alta concentración de MGO es activa frente a un amplio número de patógenos, como *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), *E. faecium* resistente a vancomicina, *P. aeruginosa* resistente a ciprofloxacina, *E. coli* en cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas, *Salmonella enterica*, *Streptococcus pyogenes* y *C. albicans* (Kwakman *et al.*, 2010; Visavadia *et al.*, 2008 ; French *et al.*, 2005; Lusby *et al.*, 2005).

### **1.5. Bioaccesibilidad y digestibilidad *in vitro***

A pesar de la abundancia y diversidad de compuestos bioactivos presentes en la miel, existen pocos reportes que analicen cómo la digestión afecta su estabilidad y funcionalidad. Entre estas aproximaciones, los ensayos de digestión simulada *in vitro* constituyen una herramienta útil para estimar en qué medida compuestos bioactivos mantienen su estabilidad tras el proceso digestivo. Si bien la aplicación de este tipo de estudios en mieles es incipiente, aportan información valiosa sobre la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad de dichos compuestos, al permitir evaluar si logran liberarse de la matriz alimentaria, resistir las condiciones gastrointestinales y alcanzar la circulación sistémica, donde podrían ejercer efectos beneficiosos en el organismo (Alevia, *et al.*, 2021; Alcoléa *et al.*, 2024).

## **1.6. Aplicaciones antimicrobianas de mieles y productos derivados**

A pesar de la creciente evidencia científica, el potencial de la miel como agente terapéutico sigue siendo subestimado en el ámbito clínico y farmacológico, en parte porque aún es necesario identificar compuestos activos con mecanismos de acción bien definidos que respalden su desarrollo como producto biológico antimicrobiano, y la inclusión de estudios clínicos en humanos (Brudzynski, 2021; Xie & Coghi, 2025). No obstante, cuando dicha validación científica se ha alcanzado, ha permitido el desarrollo comercial de mieles diferenciales o productos derivados, que constituyen ejemplos destacados de éxito tanto en términos económicos como de posicionamiento en el mercado.

En el mercado internacional existen diversas mieles y formulaciones de grado médico, cuya eficacia antimicrobiana ha sido documentada, consolidando su aplicación en el ámbito clínico. Un ejemplo es Medihoney®, derivada de la miel de Manuka, cuya actividad se asocia principalmente al metilglioxal. Otro caso es Revamil®, producida en los Países Bajos a partir de miel producida bajo condiciones controladas en invernaderos, basa su acción en la producción de peróxido de hidrógeno y defensina-1 (Carter *et al.*, 2016; Kwakman *et al.*, 2011). Por su parte, L-Mesitran®, también de origen neerlandés, corresponde a una formulación tópica enriquecida con vitaminas, lanolina y polietilenglicol con amplio espectro antimicrobiano, eficacia antibiofilm y mejor tolerancia en la cicatrización que productos basados en plata o en miel de Manuka (Pleeging *et al.*, 2020).

La aplicación directa de estos productos sobre heridas y quemaduras ha mostrado resultados positivos: aceleración de la cicatrización, disminución del dolor, reducción de la formación de cicatrices y eliminación de infecciones resistentes a antibióticos (Pleeging *et al.*, 2020; Mokhtar *et al.*, 2020; Carter *et al.*, 2016; Visavadia *et al.*, 2008; Molan, 2006).

Más allá de estas formulaciones específicas, numerosas mieles naturales de distinto origen geográfico también han demostrado propiedades antimicrobianas relevantes. La miel de Ulmo (*Eucryphia cordifolia*, Chile) presentó una actividad superior a la de Manuka frente a aislamientos clínicos de MRSA, atribuida a su elevado contenido de

peróxido de hidrógeno (Sherlock *et al.*, 2010). Resultados similares se han registrado en mieles de Canadá, en mieles de trébol dulce, arándano y trigo sarraceno (Brudzynski & Lannigan, 2012). En Arabia Saudita, la miel de Sumra mostró actividad frente a bacterias multirresistentes, efectos antifúngicos y antibiofilm vinculados a su composición fitoquímica (Bazaid *et al.*, 2022). De manera similar, mieles de Rumania evidenciaron eficacia frente a *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumoniae*, asociada a su origen floral y contenido fenólico (Hulea *et al.*, 2022).

Estos antecedentes ponen de manifiesto que, si bien ciertas mieles se han consolidado como modelos terapéuticos, la investigación sobre mieles naturales de diferentes regiones abre la posibilidad de valorizar sus propiedades bioactivas y proyectarlas hacia posibles aplicaciones biomédicas, contribuyendo al mismo tiempo a su diferenciación tanto en los mercados internacionales como en el mercado interno.

### **1.7. Clasificación, trazabilidad y perspectivas de valorización de la miel en Uruguay**

Como se mencionó anteriormente, según el Reglamento Bromatológico Nacional (RBN, 2022), las mieles se clasifican en florales -incluyendo variedades monoflorales con características específicas- y de mielada, diferenciándose entre sí por su origen, composición fisicoquímica y propiedades sensoriales. No obstante, en Uruguay no existe una normativa que establezca un umbral mínimo de polen para clasificar una miel como monofloral. En cambio, la legislación de Argentina en las Resoluciones 1051/94 y 274/95 considera una miel monofloral cuando más del 45 % del contenido polínico corresponde a una única especie vegetal predominante (INTA, 2019). Por su parte, la Unión Europea no fija un porcentaje único, pero establece que la denominación botánica debe estar respaldada por análisis melisopalínológicos y sensoriales que acrediten el origen floral predominante (Beckh & Camps, 2009).

La clasificación de la miel tiene implicancias tanto comerciales como normativas, especialmente en lo que respecta a la exportación. En Uruguay, la miel destinada a mercados internacionales debe ser procesada en salas de extracción habilitadas por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), conforme a lo dispuesto en el Decreto 29/006 (IMPO, 2006).

Para asegurar la calidad y seguridad del producto en cada etapa, se exige el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y de los Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (POES), establecidos en la Resolución 469/010, en conformidad con lo dispuesto por el Decreto 371/2013 que regula el Sistema Nacional de Trazabilidad de Productos Apícolas (SINATPA) (MGAP, 2010; IMPO, 2013). Este sistema, creado por la Ley de Presupuesto de 2010, permite la trazabilidad del producto desde el apiario hasta su comercialización, posibilitando una gestión eficaz de los riesgos en toda la cadena agroalimentaria. Además, constituye un referente en América Latina para alcanzar objetivos de trazabilidad, circularidad y reducción de emisiones (Freeman *et al.*, 2022; Pereyra, 2024).

La apicultura uruguaya se orienta principalmente a la exportación, dado el reducido consumo interno. En 2020, la disponibilidad aparente per cápita fue de 0,77 kg de miel/habitante/año de 11.811 toneladas producidas, lo que evidencia un consumo marginal en relación con la producción nacional (MGAP, 2021). Este comportamiento se asocia a factores culturales y de hábitos alimenticios que posicionan a la miel como un producto de consumo ocasional. En este contexto, la comercialización local se canaliza principalmente a través de ventas directas de apicultores y de segmentos específicos del mercado, registrando en 2025 precios de entre 280 y 350 \$U/kg de producto envasado (Pereyra, 2024).

En el mercado internacional, la miel uruguaya se comercializa principalmente a granel y ha enfrentado en los últimos años una marcada presión a la baja en los precios. En 2023, el valor promedio para los principales países exportadores fue de USD 2,38/Kg, lo que representa una disminución del 16% respecto al año anterior (DIGEGRA, 2021). En el caso de Uruguay, las exportaciones alcanzaron 7.514 toneladas en 2023, con un precio promedio de USD 2,45/Kg, equivalente a una caída del 30% en comparación con 2022. Durante el período enero-octubre de 2024, si bien el volumen exportado aumentó a 11.298 toneladas, el precio promedio continuó descendiendo, situándose en USD 2,28/Kg (Pereyra, 2024).

En contraste, Nueva Zelanda, con una producción similar a nuestro país de 12.274 toneladas, comercializa sus mieles a un valor promedio de USD 20,43 por kg (Trade Map, 2024), este posicionamiento se explica en gran medida por la valorización de la miel de Manuka. Este caso demuestra que la diferenciación basada en el origen

botánico y la evidencia de propiedades específicas constituyen un factor clave para incrementar la competitividad de la miel en el mercado.

## **1.8. La región de Montes del Queguay como área de interés apícola**

Según SINATPA se registran en Paysandú aproximadamente 69.000 colmenas, con fuerte presencia de productores familiares que practican la apicultura como actividad complementaria (Pereyra, 2024 ; Ministerio de Ambiente, 2022; Filardo & Rossi, 2020).

La región de Montes del Queguay se ubica en el departamento de Paysandú, formando parte del Corredor Biológico del Queguay, un área reconocida por su alta biodiversidad. Esta zona comprende una planicie de inundación en la confluencia de los ríos Queguay Grande y Queguay Chico, con ecosistemas interconectados como albardones, islas, bañados, lagunas y humedales, además de uno de los macizos de bosque nativo más extensos y mejor conservados del país (Ministerio de Ambiente, 2022; Filardo & Rossi, 2020).

La heterogeneidad ambiental favorece una flora diversa, incluyendo especies del bosque ribereño, monte de quebrada y bosque parque. Esta configuración otorga a la zona un alto valor ecológico y productivo, por su contribución a la conservación de servicios ecosistémicos como la regulación hídrica, la captura de carbono y el mantenimiento de la biodiversidad (Ministerio de Ambiente, 2022).

En 2014, el área fue incorporada al Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas bajo la categoría “Área Protegida con Recursos Manejados” (Decreto N.º 343/014), en atención a sus condiciones naturales relevantes, su grado de naturalidad y la presencia de especies prioritarias para la conservación. Entre las disposiciones se incluyen medidas de protección de la vegetación nativa, limitación de actividades extractivas y fomento de prácticas productivas sostenibles, como la apicultura (IMPO, 2014).

La combinación de estas condiciones, sumada a la baja presión antrópica, confiere a la región un alto potencial para la producción de mieles con identidad territorial y atributos diferenciales, como posibles propiedades antimicrobianas. En este marco, se plantea como hipótesis que las mieles de Montes del Queguay, por provenir de un ambiente con predominio de flora nativa, presentan un perfil botánico y fisicoquímico

particular asociado a actividad antimicrobiana y a la capacidad de inhibir la formación de biofilm, constituyendo un atributo diferencial con potencial para su valorización.

## 2. Objetivos de la tesis

### 2.1. Objetivo general:

Esta tesis tiene como objetivo general contribuir en la diferenciación y valorización de mieles de Montes del Queguay, Paysandú, a través de la caracterización de sus posibles propiedades antimicrobianas.

### 2.2. Objetivos específicos:

- Estudiar el origen botánico de las mieles de la región Montes del Queguay.
- Evaluar parámetros fisicoquímicos y compuestos bioactivos de las mieles de esta zona.
- Estudiar la potencial actividad antimicrobiana y antibiofilm de las mieles.
- Analizar posibles correlaciones entre los parámetros evaluados y la actividad antimicrobiana, con el fin de identificar características distintivas de las mieles de esta región.
- Explorar el impacto de la simulación digestiva *in vitro* de las mieles sobre su bioactividad.

## 3. Metodología

### 3.1. Obtención de muestras

Se tomaron muestras de mieles en los años 2022, 2023 y 2024 en la región de Montes del Queguay, Paysandú, a partir de apiarios registrados en el SINATPA (Registro Nacional de Propietarios de Colmenas), de apicultores con probada capacidad técnica. Las muestras corresponden a las cosechas realizadas durante el verano. En esta estación se colecta miel proveniente del abundante flujo de néctar y polen producido por la mayor floración del monte nativo en primavera. Las muestras colectadas fueron georreferenciadas e identificadas según el apiario de origen y el año de cosecha.

El procedimiento de muestreo se llevó a cabo siguiendo las indicaciones proporcionadas por técnicos del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). En cada apiario se seleccionaron tres colmenas de manera representativa: una ubicada en cada extremo y otra en la zona central del apiario. La miel fue extraída directamente de los marcos y recolectada en envases plásticos nuevos, aptos para almacenamiento de miel. Para evitar contaminación cruzada y conservar la identidad geográfica de cada muestra, luego de la recolección, se permitió la separación natural de impurezas (cera, restos de abejas y otros materiales sólidos) mediante sedimentación, y estas fueron retiradas cuidadosamente con espátula. Las tres fracciones individuales fueron mezcladas para conformar una muestra compuesta, considerada representativa del sitio de origen. Las muestras fueron conservadas en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente hasta su posterior análisis.

### 3.2. Estudio de contenido polínico

El análisis del contenido polínico se realizó según el método de Loveaux et al, (1970). La miel se disolvió en agua para liberar los granos de polen, luego la solución fue centrifugada y el sedimento obtenido se sometió a acetólisis con el objetivo de eliminar el material orgánico y dejar visible la exina, la capa más externa del polen. Luego de una nueva centrifugación y lavado, el sedimento se montó en gelatina-glicerina sobre portaobjetos. Las observaciones se realizaron al microscopio (aumentos de 40X y 100X en casos particulares). Se contaron hasta 1200 granos de polen por muestra, o hasta estabilizar la curva de aparición de especies. Los análisis melisopolinológicos fueron

realizados por la Lic, Gloria Daners en el Instituto de Ciencias Geológicas (Facultad de Ciencias, Universidad de la República).

### **3.3. Evaluación de características fisicoquímicas y compuestos bioactivos**

#### **3.3.1 Determinación de parámetros fisicoquímicos**

Los parámetros fisicoquímicos fueron determinados en el Laboratorio ApiUTEc (Laboratorio de Tecnología de la Miel y Productos Apícolas) (UTEc), siguiendo los métodos estandarizados de la International Honey Commission (IHC) (Bogdanov, 2009) y validados en el Codex Alimentarius.

El pH y la acidez libre se determinaron disolviendo 10 g de miel en 75 mL de agua destilada, midiendo el pH con un medidor Hanna HI 5521 (Hanna Instruments, USA) y titulando con NaOH 0,1 N hasta alcanzar un pH de 8,3.

La conductividad eléctrica se determinó a 20 °C en una solución de miel al 20% (p/v), preparada en agua destilada y ajustada a base seca, utilizando el instrumento HANNA HI5521. Los resultados fueron expresados en  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

El porcentaje de humedad se obtuvo midiendo el índice de refracción de las muestras a 20 °C con un refractómetro ABBE 5 convirtiendo la lectura en contenido de agua (g/100 g de miel) según la tabla de conversión "Relación entre el contenido de agua de la miel y el índice de refracción" (Chataway, 1932).

La concentración de hidroximetilfurfural (HMF) se determinó mediante el método de White, empleando un espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 150. La medición se basó en la absorbancia del HMF a 284 nm, con corrección por interferencias a 336 nm, comparando la absorbancia de una solución acuosa clara de miel antes y después de la adición de bisulfito de sodio al 0,1% (p/v), el cual elimina el grupo cromóforo del HMF. Los resultados fueron expresados en mg de HMF/100 g de miel, calculados a partir de la diferencia de absorbancias y un factor de conversión estandarizado:

$$\text{HMF (mg/100 g de miel)} = (\text{Abs 284} - \text{Abs 336}) * \text{Factor} * 5 / \text{g muestra}$$

Factor = 14,97

Por otro lado, el color de las mieles fue determinado mediante un colorímetro para miel HANNA HI 96785 (Hanna Instruments, USA). Los valores obtenidos se expresaron en milímetros en la escala Pfund (mm Pfund), conforme a la clasificación de color establecida por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y adoptada por la normativa Codex Alimentarius.

Los análisis fisicoquímicos se realizaron en todas las muestras luego de tiempos de conservación comparables de postcosecha. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### 3.3.2 Determinación de compuestos fenólicos totales

El contenido de fenoles totales (TPC) se determinó según el método descrito por Sancho *et al.* (2016), basado en el reactivo de Folin-Ciocalteu. Este ensayo redox se basa en la oxidación de los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos mientras el reactivo de Folin-Ciocalteu (siendo éste una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato) se reduce, generando un cambio de color de amarillo a azul cuya intensidad es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos en la muestra. Para la determinación, se mezclaron 0,5 mL de la muestra (100 mg/mL) con 2,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (0,2 N-Merck, Alemania). Luego de cinco minutos, se añadieron 2 mL de una solución de carbonato de sodio al 7,5% (p/v), y las mezclas se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente, la absorbancia se midió a 760 nm utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 150. Los resultados se expresaron como mg ácido gálico/ 100 g de miel (Merck, Alemania) utilizando una curva de calibración (0 - 100 mg/L) y como referencia se utilizó una muestra de miel de Manuka 20+ UMF.

Cabe señalar que este reactivo no presenta especificidad exclusiva por compuestos fenólicos, ya que otras sustancias con capacidad reductora, como los azúcares reductores y algunos aminoácidos presentes en la miel, también pueden reaccionar, tal como describen Lawag *et al.* (2023) y Ky *et al.* (2014).

### 3.3.3 Cuantificación de peróxido de hidrogeno

El contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se determinó de acuerdo al protocolo del kit Amplex™ Red (Thermo Fisher Scientific, Amplex™ Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit), el cual se basa en la oxidación de 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina, catalizada por la

peroxidasa de rábano picante (horseradish peroxidase, HRP) en presencia de  $H_2O_2$ . Esta reacción produce resorufina, un fluoróforo rojo, cuya formación es directamente proporcional a la concentración de  $H_2O_2$ , en una relación estequiométrica 1:1.

Para cuantificar  $H_2O_2$  las muestras de miel fueron previamente disueltas en buffer fosfato 1X (pH 7,4). Las diluciones de las muestras se realizaron inmediatamente antes del inicio del ensayo, con el fin de minimizar posibles pérdidas del analito. Se evaluaron dos concentraciones de muestra: 40% y 25% (p/v). Se trabajó con una curva de calibración en el rango de 0 a 3,5 mM de  $H_2O_2$ . Además, se incluyó en el análisis una muestra de miel de Manuka con clasificación 20+ UMF.

Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un lector de placas Varioskan™ Lux (Thermo Fisher Scientific), empleando un filtro de 530 nm para excitación y 590 nm para emisión, parámetros recomendados por el fabricante, para los que declara el límite de detección 50 nM de  $H_2O_2$  a pH 7,4. Si bien el protocolo del kit indica realizar la lectura a los 30 minutos de incubación (T0), en este estudio se incorporaron mediciones adicionales a las 4 y 6 horas (T1 y T2) con el objetivo de evaluar la estabilidad de  $H_2O_2$  en las muestras. Todas las reacciones se llevaron a cabo en ausencia de luz directa, debido a la fotosensibilidad del reactivo Amplex Red.

### 3.3.4 Análisis estadístico

Las determinaciones fisicoquímicas (pH, acidez, HMF, color y conductividad eléctrica), así como los contenidos de compuestos fenólicos totales y  $H_2O_2$ , se realizaron por triplicado y sus resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar. Para estos datos, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, previa comprobación de homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ .

Con el fin de explorar patrones de similitud o diferenciación entre las muestras se aplicaron herramientas de análisis multivariado en RStudio (R-4.4.0). Mediante un análisis de clusters jerárquicos, utilizando la distancia euclidiana como medida de similitud y el método de Ward.D, se agruparon las muestras de acuerdo con su composición polínica. Asimismo, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) considerando los parámetros fisicoquímicos.

Para las concentraciones iniciales de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (T0), se compararon los diferentes grupos de miel definidos por su origen botánico mediante diagramas de caja (boxplots) generados en RStudio (R-4.4.0). En estos gráficos, la línea central corresponde a la mediana, los bordes de la caja al primer y tercer cuartil (Q1 y Q3) y el rango intercuartílico (IQR = Q3–Q1). Los bigotes se extendieron hasta el valor mínimo y máximo dentro de 1,5×IQR, y los valores atípicos se representaron como puntos individuales. Dado que no se cumplió el supuesto de homogeneidad de varianzas, las diferencias entre grupos se evaluaron por separado para cada concentración de miel (25 % y 40 % p/v) mediante la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis, seguida de comparaciones múltiples post hoc de Dunn con ajuste de Holm.

### 3.4. Actividad antimicrobiana

Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología - Área de Microbiología de la Facultad de Química (UDELAR).

Se trabajó con los siguientes microorganismos depositados y conservados a -80 °C en la colección de cepas de la Cátedra de Microbiología: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15422), *Candida albicans* (ATCC 101231) y *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

La actividad antimicrobiana se evaluó en diferentes momentos según el año de cosecha. En particular, las muestras correspondiente a 2022 fueron evaluadas tras un período de almacenamiento aproximadamente un año mayor que el de las muestras de 2023 y 2024.

#### 3.4.1 Preparación de las suspensiones

A partir de cultivos frescos de las cepas a utilizar, crecidos en medio nutriente (Nutrient Agar, OXOID, para bacterias; Potato Dextrose Agar, OXOID, para hongos), se prepararon las suspensiones correspondientes. Las bacterias y levaduras fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas y *A. brasiliensis* a 28 °C durante 96 horas. Las suspensiones obtenidas fueron las siguientes:

- Bacterias: 1,5×10<sup>8</sup> células/mL (escala McFarland N°0,5) en solución salina fisiológica
- Levaduras: 1,5×10<sup>6</sup> células/mL (escala McFarland N°0,5) en su solución salina fisiológica

- Hongos filamentosos:  $1 \times 10^4$  esporas/mL (recuento en cámara de Neubauer) en solución salina fisiológica con Tween 20

Las muestras de mieles a estudiar en esta tesis, junto a la miel de Manuka, fueron disueltas en agua destilada estéril precalentada a 35 °C, con el fin de facilitar su homogenización sin afectar sus propiedades obteniéndose una concentración inicial de 80% (p/v). Todas las diluciones de mieles, así como las suspensiones de microorganismos, se prepararon y utilizaron el mismo día en que se realizaron los ensayos.

### 3.4.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

La Concentración Mínima Inhibitoria se determinó de acuerdo con el método estandarizado del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017) mediante la técnica de microdilución en caldo en placas de 96 pocillos (NEST- 701011) como se muestra en la Figura 3.1. A partir de una suspensión de miel al 80% (p/v), se realizaron diluciones seriadas para obtener concentraciones finales de 53,3; 26,7; 13,3; 6,7; 3,3 y 1,7% (p/v), en caldo Mueller Hinton (MHB - HIMEDIA®), por duplicado para cada muestra. Posteriormente, se añadieron 20  $\mu$ L de suspensión microbiana (descrita en 3.4.1). Se incluyeron controles de esterilidad, que contenían sólo medio de cultivo estéril, y controles de crecimiento, que contenían medio de cultivo con la suspensión microbiana. La MIC se definió como la concentración mínima de miel capaz de inhibir el crecimiento visible de los microorganismos tras 24 horas de incubación a 37 °C para las bacterias y levaduras y 48 -72 horas a 28 °C para los hongos filamentosos.

### 3.4.3 Determinación de la Concentración Mínima Microbicida

La Concentración Mínima Microbicida se determinó a partir de los caldos empleados en la prueba de MIC, se subcultivaron en placas de agar nutriente (Nutrient Agar, OXOID, para bacterias) y agar dextrosa de papa (Potato Dextrose Agar, OXOID, para hongos). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas y posteriormente se estimó el número de células viables mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) (Figura 2.1). La MMC se definió como la concentración mínima de miel capaz de eliminar el 99,9% del inóculo inicial, siguiendo el procedimiento reportado por Estevez *et al.* (2021).

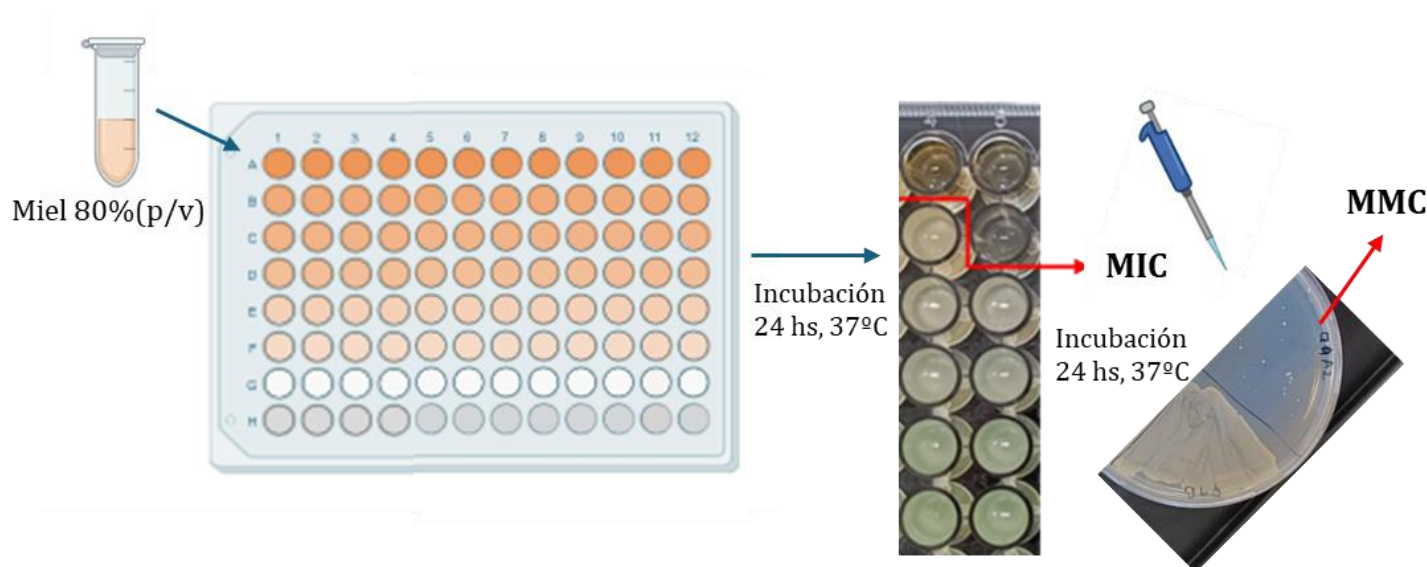


Figura 3.1. Representación gráfica con imágenes de ensayos antimicrobianos: MIC y MMC.

#### 3.4.4 Evaluación del potencial antimicrobiano de compuestos volátiles

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos volátiles presentes en las mieles se realizó mediante el método de volatilización en disco, según lo descrito por Nedorostova *et al.* (2009). Se impregnaron discos (Whatman®) con 100  $\mu\text{L}$  de miel 80 y 50% (p/v) y se colocaron en la base de placas estériles (Petri 50x15 mm). En otra base de placa de Petri con Agar Nutriente (para bacterias) o Agar Dextrosa de Papa (para levaduras), se sembraron en superficie 20  $\mu\text{L}$  de una suspensión microbiana ajustada a  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Se enfrentaron las dos bases de placas y se sellaron con Parafilm (PARAFILM® M) (Figura 3.2). Las placas se incubaron a 37°C y se evaluó a las 24 y 48 horas. Se realizaron duplicados de cada muestra a cada concentración y para cada microorganismo. Se incluyeron controles de crecimiento (medio con la suspensión microbiana y disco con agua estéril). Se comparó el crecimiento microbiano en los sistemas con discos con mieles con los sistemas control (discos con agua estéril).

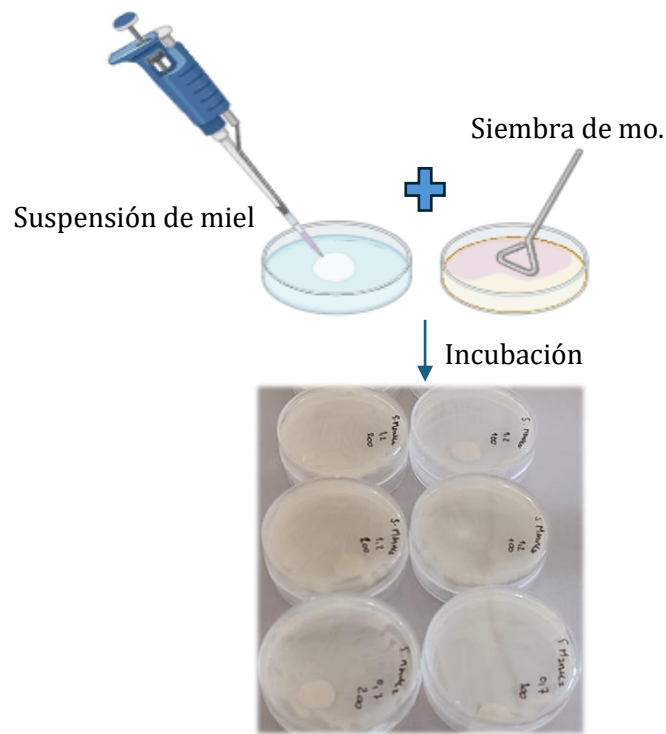


Figura 3.2. Representación del procedimiento para evaluar actividad antimicrobiana de volátiles

### 3.4.5 Evaluación de la capacidad de inhibición de la formación de biofilms

La capacidad de inhibir los biofilms producidos por *S. aureus* ATCC 6538P y *P. aeruginosa* ATCC 15422 por mieles seleccionadas, se evaluó utilizando el método de microdilución en placa, basado en la metodología descrita por Raffaelli *et al.* (2022). Se seleccionaron muestras de mieles representativas de diferentes cosechas, priorizando aquellas que presentaron los resultados más relevantes en la determinación de MIC y MMC frente a estas bacterias. Además, se utilizó la miel de Manuka como referencia y controles sobre *P. aeruginosa* de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1, 2 y 3 mM.

La evaluación se realizó en una placa de 96 pocillos (NEST-701011), en la que se prepararon diluciones seriadas de una suspensión de miel al 80% (p/v), para obtener concentraciones finales de 53,3; 26,7; 13,3 y 6,7 % (p/v) en caldo nutriente (OXOID). En cada pocillo se añadieron 20  $\mu$ L de una suspensión bacteriana ajustada a  $1 \times 10^8$  células/mL. Se incluyeron controles de esterilidad (caldo nutriente estéril) y controles de crecimiento (caldo nutriente con suspensión bacteriana, sin tratamiento) para evaluar el biofilm basal. La placa se incubó a 37 °C durante 24 horas, tras lo cual se eliminó el sobrenadante y los pocillos se lavaron con agua destilada. Posteriormente,

se secaron a 50°C por 40 minutos. Las células adheridas se tiñeron con cristal violeta al 1%, y la tinción retenida se resuspendió en etanol: acetona (70:30). La absorbancia de la solución se midió a 590 nm (ThermoLabsystems - Multiskan RC). Para calcular el porcentaje de inhibición en la formación del biofilm, se corrigieron las absorbancias del tratamiento con el valor del control de esterilidad y los resultados se expresaron como porcentaje en comparación con el control basal.

$$\% \text{Inhibición} = 100 - (100 * \overline{Abs} \text{ corregida} / \overline{Abs} \text{ basal})$$

$\overline{Abs}$  corregida = media de absorbancias de tratamiento corregida por control de esterilidad.

$\overline{Abs}$  basal = media de absorbancia del control de crecimiento basal.

Además, se determinó la Concentración Inhibitoria de Biofilm Mínima (CIBM), definida como la menor concentración de miel capaz de inhibir  $\geq 90\%$  de la formación de biofilm bacteriano en las condiciones ensayadas (Estevez *et al.*, 2022).

### 3.4.6 Análisis estadístico

Los ensayos de concentración inhibitoria mínima (MIC), concentración microbicida mínima (MMC) y volatilidad se llevaron a cabo al menos por duplicado, expresando como resultado el valor modal, de acuerdo con lo reportado por Melhem *et al.* (2022).

Para los ensayos de inhibición de la formación de biofilms, realizados por cuatriplicado, se analizó mediante ANOVA de una vía, con verificación previa de homogeneidad de varianzas (Levene), seguido por la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Con el objetivo de explorar la relación entre la actividad antimicrobiana y la composición del polen y/o el año de cosecha se utilizó el método de de partición recursiva (*Partition Analysis*), utilizando el software estadístico JMP versión 8. Los resultados de actividad antimicrobiana se analizaron como valores individuales con respuesta binaria (efecto/no efecto), obtenidos a una concentración fija de miel: 26,7% (p/v) para bacterias y 53,3% (p/v) para *C. albicans*. La respuesta binaria fue codificada numéricamente como 0 (sin efecto) y 1 (con efecto).

Adicionalmente, mediante el software estadístico R (versión R-4.4.0) y la interfase Rstudio, se generó un mapa de calor de correlaciones (*correlation heatmap* o *corrplot*) basado en los resultados de parámetros fisicoquímicos y químicos (pH, acidez, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,

fenoles), actividad antimicrobiana y de inhibición de biofilm frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*, correspondientes a 15 muestras de miel. Para este análisis exploratorio se incluyeron para actividad antimicrobiana frente a células planctónicas, los valores individuales de respuesta binaria descritos anteriormente para las concentraciones de miel seleccionadas, definiéndolas como IC (efecto inhibitorio) y MC (efecto cida).

### **3.5. Evaluación de la simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* en mieles**

Los estudios de simulación digestiva se realizaron en el marco de la pasantía de investigación asociada a la presente tesis, en el Laboratorio de Bioactividad y Nanotecnología de Alimentos del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos (Facultad de Química). Para ello se trabajó con las 14 muestras de miel correspondientes al año 2024. Cada simulación se realizó por duplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

#### **3.5.1 Metodología de la simulación gastrointestinal *in vitro***

La simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* se realizó siguiendo el protocolo estandarizado INFOGEST con algunas modificaciones (Brodkorb *et al.*, 2019; Rodríguez *et al.*, 2025), como se muestra en la Figura 3.3.

Inicialmente, se pesaron 2,5 gramos de cada muestra de miel, las cuales se diluyeron en una proporción 1:1 (p/v) con un fluido salival simulado compuesto por una mezcla de electrolitos (KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, HCl, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O). En esta fase se añadió  $\alpha$ -amilasa salival humana (75 U/mL) para emular la principal actividad enzimática de la cavidad oral. Las mezclas se incubaron a 37 °C en un baño de agua con agitación durante 2 minutos.

Posteriormente, para simular la fase gástrica, a las muestras tratadas con el fluido salival se les añadió fluido gástrico simulado en una proporción 1:1 (v/v), el cual contenía pepsina porcina (2,000 U/mL), lipasa pancreática porcina (60 U/mL) y una solución de electrolitos similar a la del fluido salival. El pH de las muestras se ajustó a 3, y se incubaron en un baño de agua con agitación a 37 °C durante 2 horas. En la fase intestinal, las muestras gástricas fueron mezcladas con fluido intestinal simulado en proporción 1:1 (v/v). Este fluido contenía pancreatina (100 U/mL), mezcla con sales

biliares, ajustado a un pH de 7. Nuevamente, las muestras fueron incubadas a 37 °C con agitación durante 2 horas. Finalmente, se inactivaron las enzimas mediante calentamiento en un baño de agua a 90 °C durante 10 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 9.000 rpm por 10 minutos a 4 °C para separar la fracción soluble (fracción bioaccesible) e insoluble (fracción colónica). Posteriormente fueron almacenadas a -20 °C hasta su análisis.

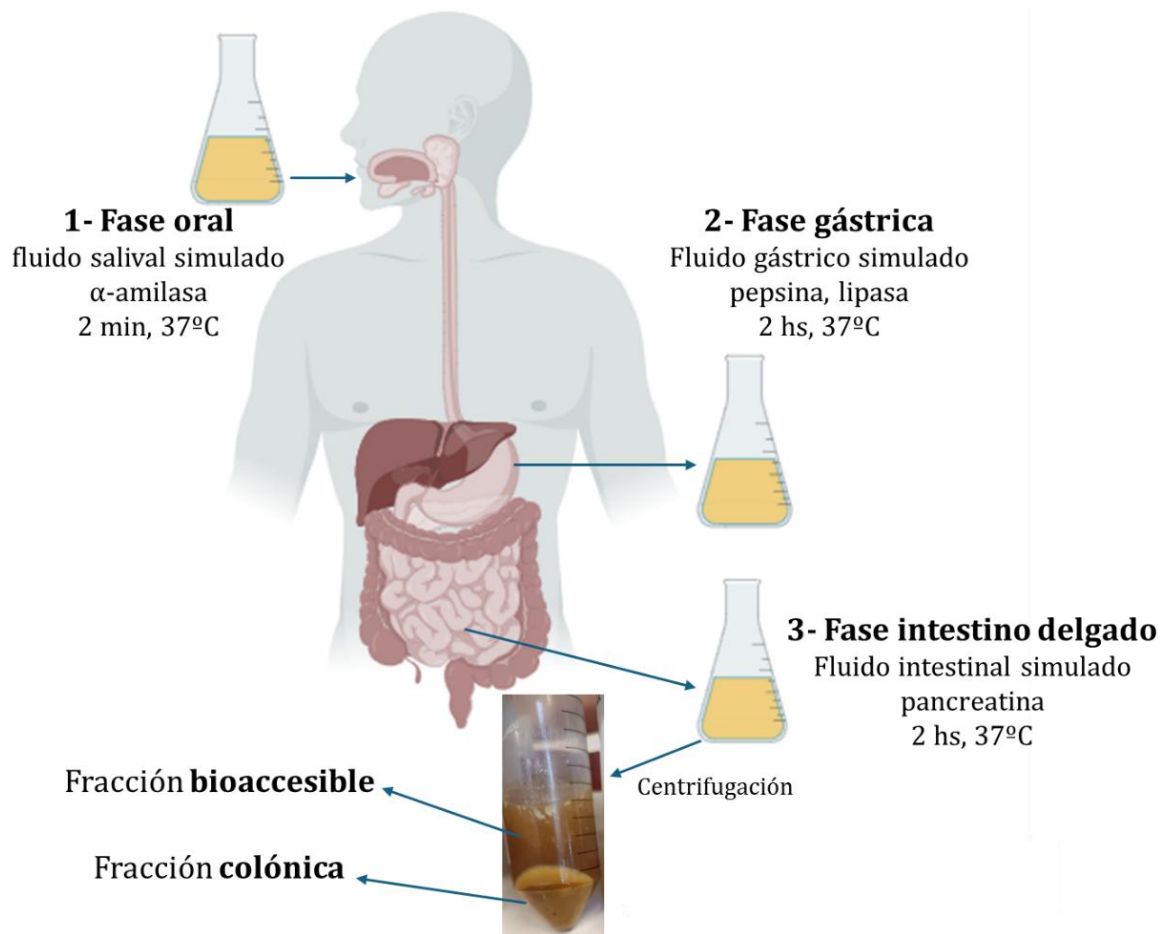


Figura 3.3. Representación gráfica de protocolo INFOGEST

### 3.5.2 Determinación de compuestos fenólicos totales de fracciones bioaccesibles

La determinación de TPC de las fracciones obtenidas tras la simulación digestiva *in vitro*, se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito previamente para las muestras de miel (sección 3.3.2), basado en el método de Folin-Ciocalteu (Sancho *et al.* 2016). Para su cuantificación, las fracciones fueron previamente diluidas en una proporción 1:100 con agua destilada. Las medidas se realizaron por triplicado. Posteriormente, se comprobó los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas (Shapiro-Wilk y Levene) para aplicar ANOVA y comparación de medias por test de Tukey, con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ .

### 3.5.3 Actividad antimicrobiana de fracciones bioaccesibles

Los ensayos de concentración inhibitoria mínima (MIC) y concentración microbicida mínima (MMC) se realizaron siguiendo el procedimiento descrito en las secciones 3.4.2 y 3.4.3. En este caso, las muestras se utilizaron sin diluir, considerando que su concentración se encuentra disminuida debido al proceso de simulación digestiva.

## 4. Resultados

### 4.1. Muestreo de mieles

En la Figura 4.1 se muestran las georreferencias de los 10 apiarios incluidos en el estudio, ubicados en la región de Montes del Queguay, perteneciente al Departamento de Paysandú. Cada punto está representado con un marcador y una letra (de A a J), que corresponde al código asignado para la identificación de las muestras de mieles recolectadas en cada sitio.

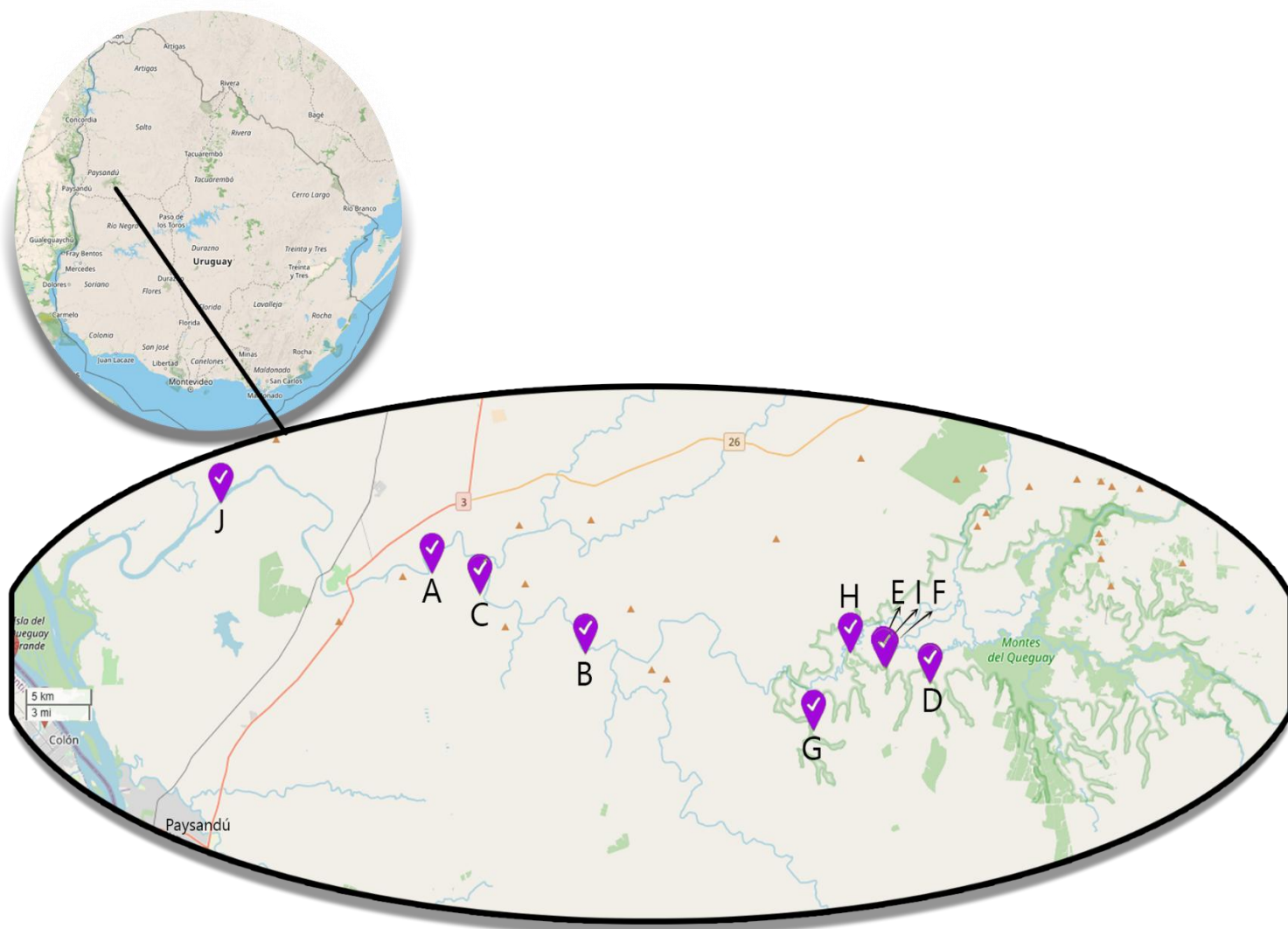


Figura 4.1. Ubicación geográfica de los 10 apiarios, identificados con las letras A a J pertenecientes a la región de Montes del Queguay, Paysandú.

Se recolectó un total de 44 muestras de mieles, correspondientes a tres cosechas sucesivas, 16 muestras pertenecen a la cosecha del año 2022, mientras que 14 provienen de la cosecha de 2023 y otras 14 del 2024. La mayoría de las muestras fueron recolectadas entre los meses de diciembre y febrero, coincidiendo con el periodo habitual de cosecha apícola.

Sin embargo, tres muestras de la cosecha 2022 (códigos 22-I2, 22-F3 y 22-F4) fueron obtenidas de forma excepcional en el mes de mayo, evidenciando una floración tardía. En la tabla 4.1 se detallan todas las muestras recolectadas, indicando su código de identificación, ubicación geográfica (A–J), año de cosecha, productor y zona del apiario.

Tabla 4.1. Identificación de las muestras de miel

<b>Código</b>	<b>Año</b>	<b>Código Geo</b>	<b>Georreferenciación</b>	<b>Apiario</b>
<b>22-A1</b>	22	A	32°07'36,6"S57°52'56,1"W	San Antonio
<b>22-B1</b>	22	B	32°10'21,5"S57°46'20,9"W	Las Pampitas
<b>22-B2</b>	22	B	32°10'21,5"S57°46'20,9"W	Las Pampitas
<b>22-C1</b>	22	C	32°08'18,3"S57°50'56,8"W	Retiro
<b>22-C2</b>	22	C	32°08'18,3"S57°50'56,8"W	Retiro
<b>22-D1</b>	22	D	32°11'16,9"S57°32'19,8"W	LG Capilla Vieja1
<b>22-E1</b>	22	E	32°10'44,1"S57°34'13,5"W	LG Capilla Vieja2
<b>22-F1</b>	22	F	32°10'45,0"S57°34'09,1"W	LG Capilla Vieja3
<b>22-F2</b>	22	F	32°10'45,0"S57°34'09,1"W	LG Capilla Vieja3
<b>22-G1</b>	22	G	32°12'50,8"S57°37'09,6"W	Puerto de Bagres
<b>22-H1</b>	22	H	32°10'15,1"S57°35'36,8"W	Puerto de Bagres
<b>22-I1</b>	22	I	32°10'47,5"S57°34'07,8"W	LG Capilla Vieja4
<b>22-I2</b>	22	I	32°10'47,5"S57°34'07,8"W	LG Capilla Vieja4
<b>22-F3</b>	22	F	32°10'45,0"S57°34'09,1"W	LG Capilla Vieja3
<b>22-F4</b>	22	F	32°10'45,0"S57°34'09,1"W	LG Capilla Vieja3
<b>22-F5</b>	22	F	32°10'45,0"S57°34'09,1"W	LG Capilla Vieja3
<b>23-A1</b>	23	A	32°07'36,6"S57°52'56,1"W	San Antonio
<b>23-B1</b>	23	B	32°10'21,5"S57°46'20,9"W	Las Pampitas
<b>23-B2</b>	23	B	32°10'21,5"S57°46'20,9"W	Las Pampitas
<b>23-B3</b>	23	B	32°10'21,5"S57°46'20,9"W	Las Pampitas

<b>23-D1</b>	23	D	32°11'16,9"S57°32'19,8"W	LG Capilla Vieja1
<b>23-D2</b>	23	D	32°11'16,9"S57°32'19,8"W	LG Capilla Vieja1
<b>23-E1</b>	23	E	32°10'44,1"S57°34'13,5"W	LG Capilla Vieja2
<b>23-E2</b>	23	E	32°10'44,1"S57°34'13,5"W	LG Capilla Vieja2
<b>23-F1</b>	23	F	32°10'45,0"S57°34'09,1"W	LG Capilla Vieja3
<b>23-F2</b>	23	F	32°10'45,0"S57°34'09,1"W	LG Capilla Vieja3
<b>23-G1</b>	23	G	32°12'50,8"S57°37'09,6"W	Puerto de Bagres
<b>23-G2</b>	23	G	32°12'50,8"S57°37'09,6"W	Puerto de Bagres
<b>23-H1</b>	23	H	32°10'15,1"S57°35'36,8"W	Puerto de Bagres
<b>23-H2</b>	23	H	32°10'15,1"S57°35'36,8"W	Puerto de Bagres
<b>24-B2</b>	24	B	32°10'21,5"S57°46'20,9"W	Las Pampitas
<b>24-B3</b>	24	B	32°10'21,5"S57°46'20,9"W	Las Pampitas
<b>24-D1</b>	24	D	32°11'16,9"S57°32'19,8"W	LG Capilla Vieja1
<b>24-D2</b>	24	D	32°11'16,9"S57°32'19,8"W	LG Capilla Vieja1
<b>24-E1</b>	24	E	32°10'44,1"S57°34'13,5"W	LG Capilla Vieja2
<b>24-E2</b>	24	E	32°10'44,1"S57°34'13,5"W	LG Capilla Vieja2
<b>24-F1</b>	24	F	32°10'45,0"S57°34'09,1"W	LG Capilla Vieja3
<b>24-F2</b>	24	F	32°10'45,0"S57°34'09,1"W	LG Capilla Vieja3
<b>24-F6</b>	24	F	32°10'45,0"S57°34'09,1"W	LG Capilla Vieja3
<b>24-G1</b>	24	G	32°12'50,8"S57°37'09,6"W	Puerto de Bagres
<b>24-H1</b>	24	H	32°10'15,1"S57°35'36,8"W	Puerto de Bagres
<b>24-I1</b>	24	I	32°10'47,5"S57°34'07,8"W	LG Capilla Vieja4
<b>24-I2</b>	24	I	32°10'47,5"S57°34'07,8"W	LG Capilla Vieja4
<b>24-J1</b>	24	J	32°05'15,3"S58°01'39,4"W	La Aguada

## 4.2. Estudio de contenido polínico

El muestreo trienal realizado en la región permitió obtener una representación de las características florales del área de estudio en la temporada de mayor flujo de néctar de primavera. En las Figuras 4.2 a 4.4 y en el Anexo 1 se presentan los resultados, los cuales ilustran el contenido porcentual de polen en cada muestra por año.

Con el objetivo de agrupar las muestras según su composición polínica, se realizó un análisis multivariado mediante clúster con distancia euclidiana como métrica de similitud y el método de Ward,D, como criterio de agrupamiento. En esta tesis se denominará como monofloral cuando más del 45 % del contenido polínico corresponda a una única especie vegetal predominante, sin embargo, para *Eucalyptus* sp. se consideró un umbral  $\geq 70$  %, dado que su polen puede presentar sobre-representación en el espectro polínico. A partir del análisis del dendrograma resultante, se identificaron cinco grupos principales en función del punto de corte seleccionado: G1 (Polifloral), G2 (*Blepharocalyx salicifolius*), G3 (*Scutia buxifolia*), G4 (*Terminalia australis*) y G5 (*Eucalyptus* sp) (Figura 4.5).

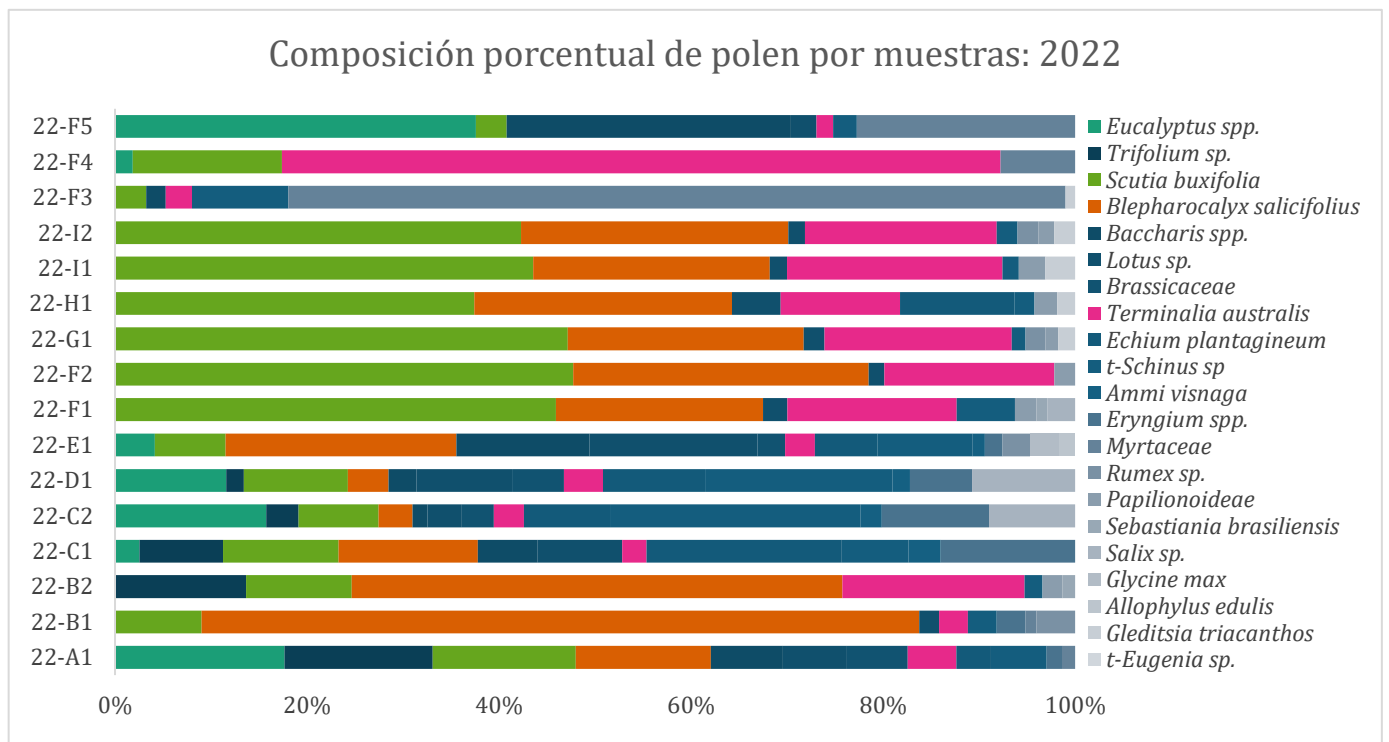


Figura 4.2. Cosecha 2022. El contenido polínico de cada muestra se representa en barras apiladas y en diferentes colores las especies identificadas.

### Composición porcentual de polen por muestras: 2023

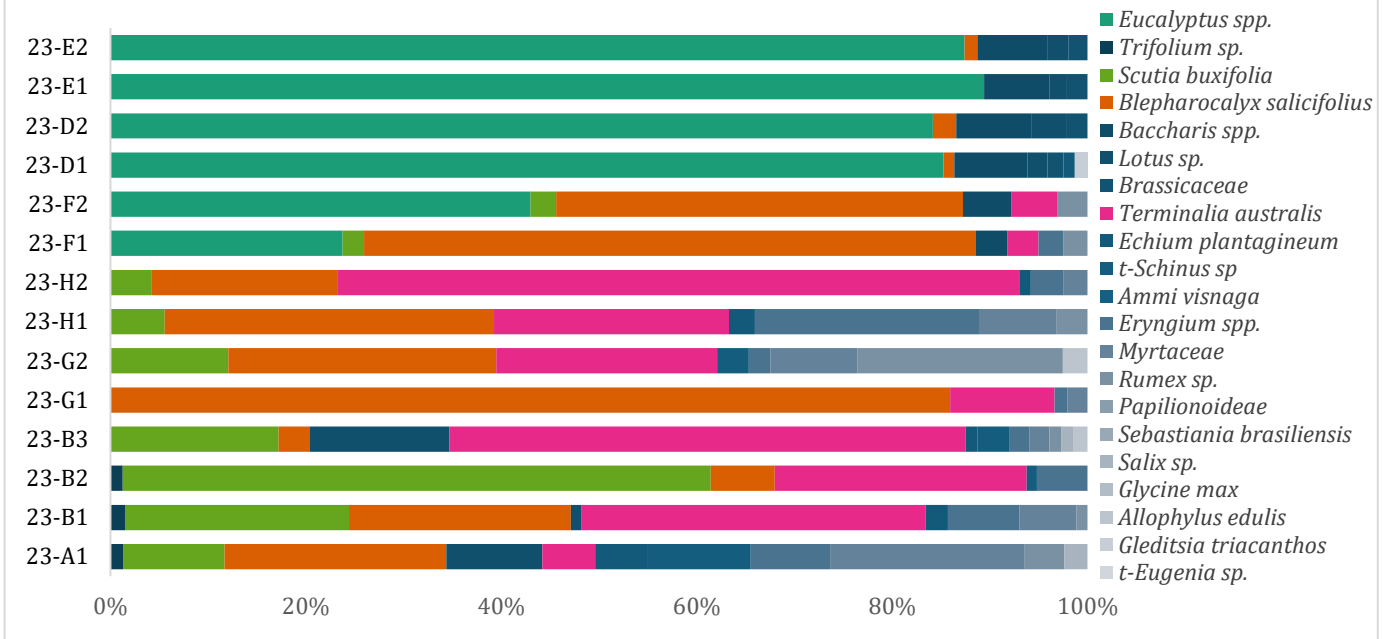


Figura 4.3. Cosecha 2023. El contenido polínico de cada muestra se representa en barras apiladas y en diferentes colores las especies identificadas.

### Composición porcentual de polen por muestra:2024

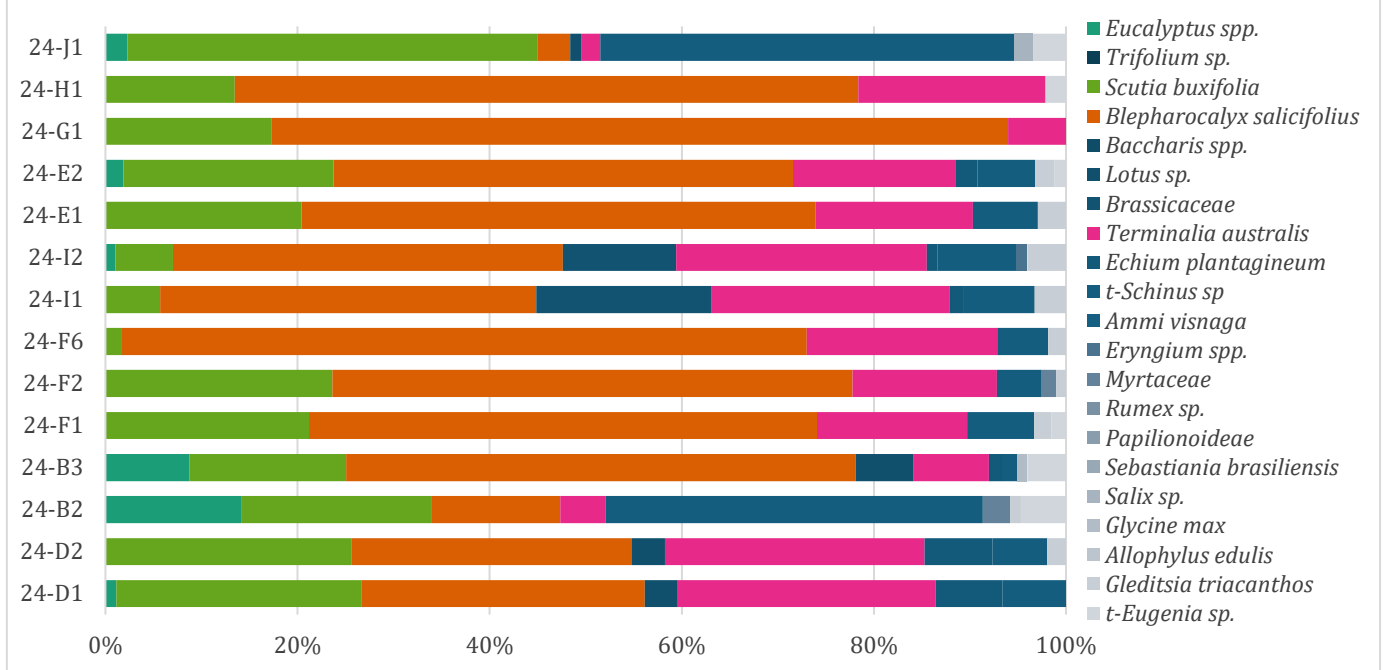


Figura 4.4. Cosecha 2024. El contenido polínico de cada muestra se representa en barras apiladas y en diferentes colores las especies identificadas.

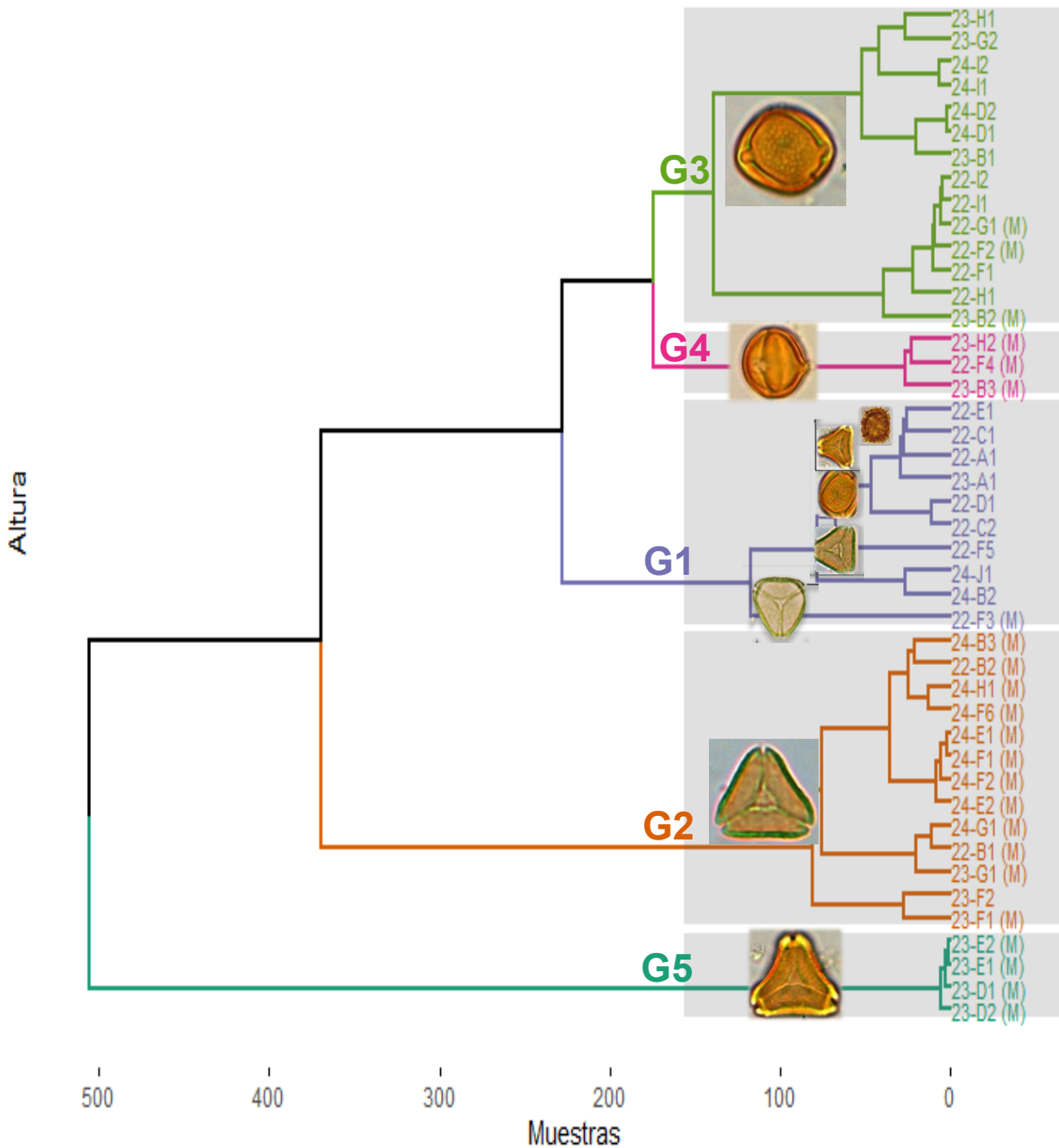


Figura 4.5. Dendrograma de agrupamiento jerárquico basado en la composición polínica de las mieles con imágenes representativas de polen mayoritario. Se identificaron cinco grupos principales, representados en diferentes colores: celeste (G1 - Poliflorales), anaranjado (G2 - *B. salicifolius*), verde claro (G3 - *S. buxifolia*), rosado (G4 - *T. asutralis*), verde oscuro (G5 - *Eucaliptus* sp.). Las etiquetas (M) señalan aquellas clasificadas como monoflorales.

### **4.3. Evaluación de características fisicoquímicas**

En la Tabla 4.2 se presentan los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados sobre las 44 muestras de mieles, agrupados en los cinco clústeres en función de su composición polínica. La conductividad eléctrica (EC) de las muestras varió entre 693,2 y 1321,7  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , mientras que los valores de acidez libre se ubicaron en un rango de 12,8 a 43,1 meq/Kg. El color medido en milímetros en la escala Pfund se encontró entre 73,3 y 119,7 mm, lo que permitió clasificar las muestras dentro de la categoría de ámbar. En cuanto al pH, los valores registrados fluctuaron entre 3,84 y 5,11, la humedad entre 15,4 y 19,0 g/100 g, y el contenido de hidroximetilfurfural (HMF) entre 18,0 y 66,1 mg/kg.

Tabla 4.2. Resultados de los análisis fisicoquímicos de las muestras de miel (n = 44). Se presentan los valores como media  $\pm$  desviación estándar (SD). Donde Grupo corresponde a: 1, Polifloral; 2, *B. salicifolius*; 3, *S. buxifolia*; 4, *T. asutralis*; 5, *Eucalyptus* sp.

Grupo	Muestra	EC ( $\mu$ S/cm) $\pm$ SD	Acidez (meq/Kg) $\pm$ SD	Color (mmPfund) $\pm$ SD	pH $\pm$ SD	Humedad (%) $\pm$ SD	HMF (mg/Kg) $\pm$ SD
1	22-A1	693,2 $\pm$ 8,9	34,4 $\pm$ 0,6	117,3 $\pm$ 1,5	3,84 $\pm$ 0,03	16,6 $\pm$ 0,2	66,1 $\pm$ 0,4
1	22-C1	1049,1 $\pm$ 2,7	20,8 $\pm$ 2,3	99,7 $\pm$ 0,6	4,01 $\pm$ 0,03	17,0 $\pm$ 0,1	35,0 $\pm$ 0,8
1	22-C2	781,9 $\pm$ 5,3	22,1 $\pm$ 1,2	102,7 $\pm$ 1,5	4,01 $\pm$ 0,03	16,6 $\pm$ 0,2	32,9 $\pm$ 0,8
1	22-D1	791,3 $\pm$ 1,4	22,3 $\pm$ 1,1	104,7 $\pm$ 1,5	4,02 $\pm$ 0,02	16,6 $\pm$ 0,0	27,3 $\pm$ 0,6
1	22-E1	751,7 $\pm$ 7,0	33,6 $\pm$ 1,8	119,7 $\pm$ 1,1	3,84 $\pm$ 0,02	17,8 $\pm$ 0,2	28,7 $\pm$ 1,3
1	22-F3	817,3 $\pm$ 1,8	15,8 $\pm$ 0,4	85,3 $\pm$ 1,1	4,30 $\pm$ 0,05	16,6 $\pm$ 0,1	32,1 $\pm$ 1,0
1	22-F5	825,5 $\pm$ 5,4	16,5 $\pm$ 0,5	90,3 $\pm$ 1,5	4,20 $\pm$ 0,06	17,7 $\pm$ 0,1	46,7 $\pm$ 1,2
1	23-A1	790,8 $\pm$ 1,0	43,1 $\pm$ 3,7	90,3 $\pm$ 0,6	4,71 $\pm$ 0,05	17,1 $\pm$ 0,2	24,8 $\pm$ 2,8
1	24-B2	1031,0 $\pm$ 1,0	27,6 $\pm$ 0,2	83,5 $\pm$ 0,7	4,48 $\pm$ 0,01	18,8 $\pm$ 0,6	44,7 $\pm$ 2,1
1	24-J1	1233,7 $\pm$ 1,5	27,8 $\pm$ 0,3	111,0 $\pm$ 1,0	4,75 $\pm$ 0,06	17,3 $\pm$ 1,2	26,0 $\pm$ 0,7
2	22-B1	743,5 $\pm$ 10,3	27,6 $\pm$ 1,9	96,7 $\pm$ 0,6	4,04 $\pm$ 0,01	16,6 $\pm$ 0,2	33,2 $\pm$ 1,5
2	22-B2	931,6 $\pm$ 4,9	34,6 $\pm$ 0,8	115,3 $\pm$ 1,5	4,25 $\pm$ 0,02	17,0 $\pm$ 0,1	28,7 $\pm$ 0,6
2	23-G1	1143,0 $\pm$ 1,0	28,6 $\pm$ 0,1	73,3 $\pm$ 0,8	5,03 $\pm$ 0,02	15,8 $\pm$ 0,0	19,6 $\pm$ 0,4
2	23-F1	1131,0 $\pm$ 1,7	42,8 $\pm$ 1,7	90,0 $\pm$ 1,1	4,77 $\pm$ 0,05	18,6 $\pm$ 0,0	22,5 $\pm$ 1,4
2	23-F2	1166,7 $\pm$ 3,0	36,5 $\pm$ 1,3	78,3 $\pm$ 2,7	4,86 $\pm$ 0,12	18,6 $\pm$ 0,0	24,4 $\pm$ 1,2
2	24-B3	1158,3 $\pm$ 2,1	32,3 $\pm$ 1,1	91,5 $\pm$ 0,7	4,51 $\pm$ 0,04	17,8 $\pm$ 1,2	48,4 $\pm$ 1,5
2	24-F1	1321,7 $\pm$ 3,1	24,1 $\pm$ 0,1	83,0 $\pm$ 0,0	4,78 $\pm$ 0,01	17,7 $\pm$ 0,9	22,8 $\pm$ 1,9
2	24-F2	1191,3 $\pm$ 5,7	25,8 $\pm$ 1,4	82,5 $\pm$ 0,7	4,82 $\pm$ 0,03	17,6 $\pm$ 0,5	23,4 $\pm$ 0,9
2	24-F6	1195,0 $\pm$ 3,6	26,5 $\pm$ 1,5	83,0 $\pm$ 0,0	4,78 $\pm$ 0,01	18,5 $\pm$ 0,2	22,9 $\pm$ 1,9
2	24-E1	1240,0 $\pm$ 2,6	24,5 $\pm$ 0,6	90,5 $\pm$ 0,7	4,82 $\pm$ 0,05	17,6 $\pm$ 0,9	23,2 $\pm$ 1,0
2	24-E2	1232,3 $\pm$ 5,1	23,7 $\pm$ 0,9	86,5 $\pm$ 0,7	4,75 $\pm$ 0,03	17,7 $\pm$ 0,3	24,3 $\pm$ 0,7
2	24-G1	1235,3 $\pm$ 2,1	19,1 $\pm$ 0,4	88,5 $\pm$ 0,7	5,11 $\pm$ 0,01	18,6 $\pm$ 0,4	23,1 $\pm$ 1,3
2	24-H1	1137,7 $\pm$ 1,5	29,9 $\pm$ 0,5	82,0 $\pm$ 0,0	4,50 $\pm$ 0,03	18,7 $\pm$ 0,4	18,0 $\pm$ 0,7
3	22-F1	923,1 $\pm$ 1,6	14,8 $\pm$ 0,9	73,7 $\pm$ 0,6	4,54 $\pm$ 0,10	16,6 $\pm$ 0,1	25,0 $\pm$ 0,5
3	22-F2	923,4 $\pm$ 3,9	14,6 $\pm$ 1,2	75,0 $\pm$ 2,0	4,50 $\pm$ 0,01	16,6 $\pm$ 0,1	24,5 $\pm$ 0,7
3	22-G1	923,4 $\pm$ 2,1	16,3 $\pm$ 0,6	74,7 $\pm$ 0,6	4,50 $\pm$ 0,02	17,4 $\pm$ 0,1	30,3 $\pm$ 0,3

3	22-H1	926,9±1,7	14,1±0,9	85,0±2,0	4,60±0,04	16,6±0,1	31,9±0,5
3	22-I1	938,4±2,1	16,6±0,4	84,0±2,7	4,60±0,06	17,1±0,1	30,4±2,2
3	22-I2	938,8±9,1	12,8±0,9	84,3±4,0	4,50±0,01	16,1±0,2	33,0±1,5
3	23-B1	879,0±2,2	28,8±1,7	91,0±1,1	4,68±0,00	16,6±0,0	32,6±0,9
3	23-B2	928,2±7,8	23,9±0,8	89,4±0,6	4,82±0,00	16,8±0,0	33,6±2,1
3	23-G2	1127,7±5,1	31,9±0,5	83,0±1,2	5,09±0,00	15,4±0,0	35,8±0,6
3	23-H1	1217,7±9,7	42,5±0,3	85,0±2,3	5,08±0,10	18,6±0,0	26,7±2,9
3	24-D1	1219,7±5,9	30,2±0,4	92,5±0,7	4,65±0,03	17,7±0,2	20,4±1,2
3	24-D2	1222,7±0,6	30,6±0,9	86,5±0,7	4,66±0,04	17,9±0,7	24,5±1,5
3	24-I1	714,9±0,8	25,1±0,2	76,5±0,7	4,36±0,01	18,9±0,2	23,9±1,5
3	24-I2	695,8±2,4	23,7±1,1	75,0±0,0	4,41±0,11	17,8±1,2	25,2±0,9
4	22-F4	887,9±6,2	17,3±1,2	96,7±2,5	4,40±0,05	17,5±0,1	30,3±2,8
4	23-B3	937,1±0,7	24,4±0,8	87,7±1,3	4,76±0,10	17,2±0,8	36,8±1,6
4	23-H2	1041,0±9,5	25,8±1,6	75,3±0,8	4,75±0,03	18,6±0,0	19,1±1,6
5	23-D1	892,9±9,6	26,9±0,2	92,3±0,6	4,77±0,07	19,0±0,0	35,6±0,2
5	23-D2	858±37	28,7±1,6	87,0±0,0	4,65±0,01	18,2±0,0	34,1±3,6
5	23-E1	893,7±1,1	27,8±1,3	88,0±0,0	4,62±0,01	18,6±0,0	38,3±0,4
5	23-E2	890,0±8,1	26,2±0,3	86,3±0,7	4,66±0,03	18,6±0,0	37,8±0,8

Además, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) sobre los parámetros fisicoquímicos, con el objetivo de explorar si las relaciones entre conductividad eléctrica (EC), acidez libre, color, pH, humedad y contenido de hidroximetilfurfural (HMF) permiten una posible agrupación de las muestras en función de características comunes como origen botánico o año de cosecha. En la Figura 4.6 se muestra la distribución de las muestras en el espacio definido por las dos primeras dimensiones del análisis de componentes principales (PCA), que en conjunto explican el 64,3 % de la varianza total (Dim1: 41,5 %; Dim2: 22,8 %). Las flechas representan la dirección y magnitud de la contribución de cada variable a estos componentes.

Los puntos corresponden a las muestras individuales, coloreadas según el grupo de clúster asignado previamente, mientras que las elipses indican la dispersión de cada grupo dentro del espacio multivariado. Los símbolos de mayor tamaño representan los centroides de cada grupo, calculados como el promedio de las coordenadas de los individuos en las dimensiones principales Dim1 y Dim2. Las elipses se muestran para los grupos 1, 2, 3 y 5, mientras que para el grupo 4 no se presenta debido al bajo número de muestras ( $n = 3$ ) y a que dos de ellas presentan coordenadas muy próximas en el plano, lo que impide estimar la covarianza para mostrar la elipse.

Si bien existe un solapamiento entre las elipses, se identifican tendencias por grupo: el grupo 1 se extiende hacia valores negativos de Dim1, en la dirección de HMF y color, mientras que el grupo 2 se proyecta principalmente hacia valores positivos de Dim1, asociado con pH y EC. El grupo 3 exhibe una elipse más alargada y una dispersión amplia, sugiriendo mayor heterogeneidad interna y un gradiente en Dim2 vinculado con acidez y humedad. Los grupos 4 y 5 se concentran cerca del origen.

Los valores promedio de pH y acidez libre (parámetros asociados con la actividad antimicrobiana) correspondientes a los grupos definidos por dendograma se presentan en la Tabla 4.3. El pH fue significativamente menor en el Grupo 1 ( $4,2 \pm 0,3$ ) en comparación con los Grupos 2, 3 y 5. La acidez libre osciló entre  $22,5 \pm 4,6$  y  $28,9 \pm 6,3$  meq/kg, sin observarse diferencias significativas entre los grupos.

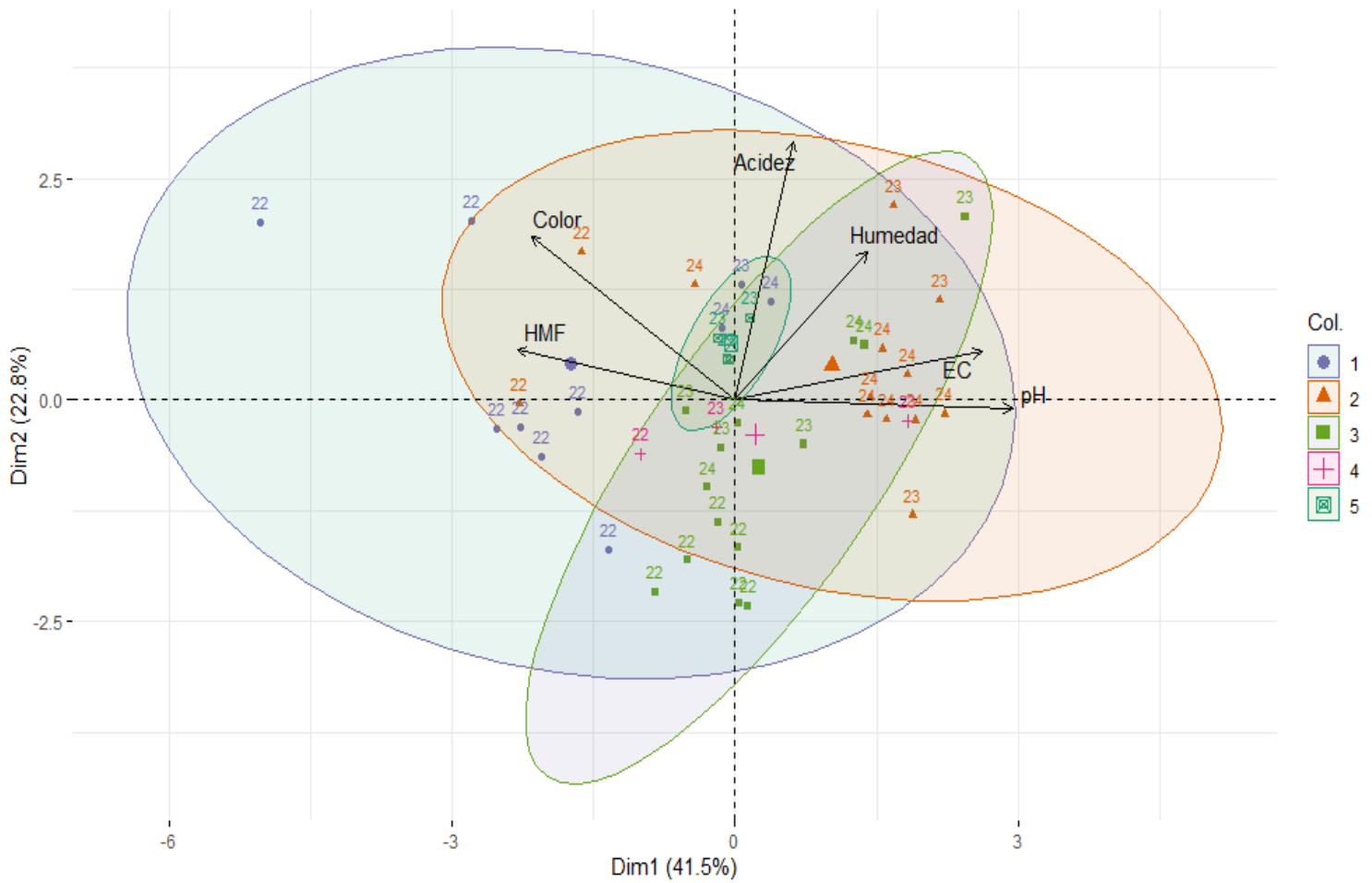


Figura 4.6. Análisis de Componentes Principales (PCA) de los parámetros fisicoquímicos correspondientes a tres cosechas indicadas por números 22, 23 y 24. Los puntos representan las muestras individuales. Cada grupo (G1 a G5) se distingue por color y forma.

Tabla 4.3. Variables fisicoquímicas por grupo de clústeres. Los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar, Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ) según Tukey,

Grupo	n	Acidez	pH
1	10	26,4 $\pm$ 2,4 a	4,2 $\pm$ 0,1 a
2	13	28,9 $\pm$ 2,1 a	4,7 $\pm$ 0,1 b
3	14	23,3 $\pm$ 2,0 a	4,6 $\pm$ 0,1 b
4	3	22,5 $\pm$ 4,3 a	4,6 $\pm$ 0,2 ab
5	4	27,4 $\pm$ 3,8 a	4,7 $\pm$ 0,1 b

#### **4.4. Determinación de compuestos fenólicos totales**

En la Tabla 4.4 se presentan los resultados de TPC de las muestras correspondientes a las tres cosechas, agrupadas según el dendograma polínico. En la cosecha 2022 se registraron los valores más elevados, destacándose la muestra 22-E1 (grupo 1) con  $1703,5 \pm 37,3$  mg/kg. Para la cosecha 2023, el valor máximo correspondió a la muestra 23-H1 (grupo 3) con  $1073,7 \pm 19,2$  mg/kg, mientras que en 2024 el mayor TPC se observó en la muestra 24-I2 con  $990,3 \pm 5,5$  mg/kg del grupo 4. Como referencia, la miel de Manuka presentó un TPC de  $763,1 \pm 5,9$  mg ácido gálico/kg.

En cuanto a la comparación por grupos (Tabla 4.5), no se detectaron diferencias significativas en el TPC. Sin embargo, al considerar el efecto del año de cosecha, las mieles de 2022 mostraron un contenido significativamente mayor de TPC en comparación con las de 2023 y 2024.

Tabla 4.4. Contenido de compuestos fenólicos totales por muestra

Cosecha	Grupo	Muestra	TPC (mg ac.gálico/kg)	Cosecha	Grupo	Muestra	TPC (mg ac.gálico/kg)
22	1	22-A1	1583,2 ± 34,9	22	3	22-F1	1058,4 ± 24,1
22	1	22-C1	1211,3 ± 27,3	22	3	22-F2	1038,2 ± 23,7
22	1	22-C2	1234,1 ± 26,7	22	3	22-G1	1111,9 ± 25,2
22	1	22-D1	943,5 ± 21,8	22	3	22-H1	1042,8 ± 23,8
22	1	22-E1	1703,5 ± 37,3	22	3	22-I1	998,3 ± 22,9
22	1	22-F3	894,7 ± 20,8	22	3	22-I2	1191,3 ± 26,9
22	1	22-F5	946,9 ± 37,1	23	3	23-B1	879,5 ± 2,9
23	1	23-A1	970,0 ± 23,9	23	3	23-B2	863,7 ± 14,8
24	1	24-B2	852,0 ± 11,7	23	3	23-G2	1012,1 ± 20,9
24	1	24-J1	563,7 ± 18,7	23	3	23-H1	1073,7 ± 19,2
22	2	22-B1	1131,4 ± 25,6	24	3	24-D1	875,2 ± 13,7
22	2	22-B2	1661,2 ± 36,5	24	3	24-D2	877,8 ± 4,4
23	2	23-G1	844,8 ± 22,0	24	3	24-I1	543,2 ± 7,7
23	2	23-F1	848,3 ± 5,8	24	3	24-I2	990,3 ± 5,5
23	2	23-F2	853,0 ± 17,9	22	4	22-F4	1008,3 ± 23,1
24	2	24-B3	899,0 ± 3,7	23	4	23-B3	849,9 ± 36,6
24	2	24-F1	834,2 ± 8,6	23	4	23-H2	825,2 ± 23,3
24	2	24-F2	821,8 ± 5,4	23	5	23-D1	780,1 ± 57,5
24	2	24-F6	805,7 ± 9,0	23	5	23-D2	750,4 ± 44,0
24	2	24-E1	805,4 ± 3,6	23	5	23-E1	725,2 ± 12,4
24	2	24-E2	800,8 ± 9,7	23	5	23-E2	733,4 ± 25,0
24	2	24-G1	964,0 ± 2,1				
24	2	24-H1	763,1 ± 5,9				

Tabla 4.5. TPC por grupo de clústeres y cosecha. Los resultados se expresan como media ± error estándar. Letras iguales indican ausencia de diferencia significativa entre grupos ( $p < 0,05$ ) según Tukey.

Grupo	n	TPC (mg ac.gálico/kg)
1	10	1090,3 ± 73,7 a
2	13	925,6 ± 64,6 a
3	14	968,3 ± 62,3 a
4	3	894,5 ± 134,5 a
5	4	747,3 ± 116,5 a
Cosecha	n	TPC (mg ac.gálico/kg)
2022	16	1211,2 ± 63,8 a
2023	14	896,8 ± 26,3 b
2024	14	867,8 ± 37,7 b

#### 4.5. Cuantificación de peróxido de hidrogeno

La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las muestras se midió a dos diluciones de miel diferentes (40 y 25 % p/v) y se evaluó a tres tiempos: T0 (30 min), T1 (4 h) y T2 (6 h). Los resultados, expresados como concentración media en mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ± desviación estándar, se presentan en la Tabla 4.6. A T0 y concentración de miel 40 % (p/v), las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oscilaron entre 1,11 ± 0,34 mM (muestra 22-B1) y 2,79 ± 0,12 mM (22-D1), mientras que a concentración de miel 25 % (p/v) las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron mayores, con un máximo de 3,10 ± 0,10 mM (24-H1) y un mínimo de 1,87 ± 0,19 mM (22-E1).

En el diagrama de caja de la Figura 4.7 se muestra la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mM) a T0 para los distintos grupos y a las dos concentraciones de miel evaluadas. La miel de Manuka (grupo 0) presentó las concentraciones más bajas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mediana 1,1 mM) para ambas concentraciones; sin embargo, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas de los grupos 1 y 2. Las mieles de los grupos 3, 4 y 5 presentaron concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> más elevadas, con una tendencia consistente a valores mayores en la dilución al 25% (p/v) en comparación con 40% (p/v). En particular, las medianas a 25%(p/v) estuvieron entre 2,5 mM (G1 Poliflorales; Q1-Q3: 2,34-2,79) y 2,9 mM (G5 *Eucalyptus* sp Q1-Q3; 2,87-2,96), mientras que a 40% variaron entre 1,9 mM (G1 Poliflorales Q1-Q3; 1,75-2,29) y 2,4 mM (G3 *S. buxifolia* Q1-Q3; 2,24-2,64).

Mediante la prueba de comparaciones múltiples (Figura 4.7) se pueden observar diferencias significativas entre los grupos de mieles (G1 al G5). A la concentración 40% (p/v), el grupo de *S. buxifolia* (G3) presentó mayores concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se diferenció de las mieles Poliflorales (G1) y de las de *B. salicifolius* (G2). A la concentración 25% (p/v), el grupo de mieles de *Eucalyptus* sp. (G5) presentó la concentración más alta de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diferenciándose significativamente de G1 y G2; además, a esta concentración de miel, las del grupo de *S. buxifolia* también mostraron concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> significativamente superior a las mieles Poliflorales.

Tabla 4.6. Determinación del contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(mM) por muestra, a dos concentraciones de miel (40 % y 25 % p/v) y tres tiempos de evaluación (30 min, 4 h y 6 h).

Muestra	40 % (p/v)			25 % (p/v)		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2
22-A1	1,77 ± 0,14	0,31 ± 0,11	ILC	2,33 ± 0,01	1,57 ± 0,06	0,24 ± 0,05
22-C1	1,82 ± 0,27	1,48 ± 0,44	ILC	2,78 ± 0,12	2,40 ± 0,30	0,92 ± 0,25
22-C2	2,03 ± 0,22	0,87 ± 0,16	ILC	2,36 ± 0,51	1,84 ± 0,37	0,46 ± 0,30
22-D1	2,79 ± 0,12	2,05 ± 0,12	1,44 ± 0,12	2,57 ± 0,09	1,83 ± 0,09	1,22 ± 0,09
22-E1	1,70 ± 0,52	0,96 ± 0,09	0,35 ± 0,09	1,87 ± 0,19	1,13 ± 0,19	0,52 ± 0,19
22-F3	2,37 ± 0,26	1,63 ± 0,26	1,02 ± 0,26	2,63 ± 0,12	1,89 ± 0,12	1,28 ± 0,12
22-F5	2,50 ± 0,18	1,76 ± 0,18	1,15 ± 0,18	2,91 ± 0,05	2,17 ± 0,05	1,56 ± 0,05
23-A1	1,52 ± 0,14	0,31 ± 0,19	ILC	2,43 ± 0,21	1,40 ± 0,15	0,10 ± 0,06
24-B2	1,99 ± 0,10	0,82 ± 0,05	0,79 ± 0,05	2,33 ± 0,12	1,57 ± 0,13	1,61 ± 0,13
24-J1	2,11 ± 0,23	1,73 ± 0,23	1,35 ± 0,21	2,85 ± 0,06	2,89 ± 0,08	2,54 ± 0,08
22-B1	1,11 ± 0,34	0,71 ± 0,67	ILC	2,38 ± 0,19	2,41 ± 0,29	0,54 ± 0,79
22-B2	1,45 ± 0,14	0,87 ± 0,49	ILC	2,18 ± 0,12	1,78 ± 0,59	0,41 ± 0,49
23-G1	2,11 ± 0,22	0,62 ± 0,11	ILC	2,98 ± 0,07	1,58 ± 0,15	0,24 ± 0,13
23-F1	2,35 ± 0,12	1,22 ± 0,20	0,84 ± 0,19	2,72 ± 0,12	2,16 ± 0,06	1,76 ± 0,07
23-F2	1,58 ± 0,14	1,14 ± 0,04	0,76 ± 0,06	2,06 ± 0,17	2,68 ± 0,09	1,88 ± 0,13
24-B3	1,83 ± 0,15	0,79 ± 0,11	0,75 ± 0,09	1,99 ± 0,50	1,28 ± 0,41	1,32 ± 0,43
24-F1	1,96 ± 0,19	0,91 ± 0,11	0,94 ± 0,12	2,60 ± 0,08	1,72 ± 0,14	1,76 ± 0,15
24-F2	1,94 ± 0,09	1,01 ± 0,14	1,03 ± 0,12	2,29 ± 0,26	1,54 ± 0,19	1,59 ± 0,19
24-F6	2,18 ± 0,16	1,33 ± 0,20	1,36 ± 0,18	2,35 ± 0,25	1,70 ± 0,19	1,77 ± 0,18
24-E1	2,31 ± 0,09	2,00 ± 0,14	1,61 ± 0,13	2,87 ± 0,07	2,94 ± 0,11	2,60 ± 0,09
24-E2	2,33 ± 0,21	1,69 ± 0,09	1,14 ± 0,16	2,89 ± 0,17	2,73 ± 0,18	2,22 ± 0,29
24-G1	2,52 ± 0,08	2,23 ± 0,08	1,91 ± 0,09	2,83 ± 0,25	2,71 ± 0,17	2,38 ± 0,18
24-H1	2,63 ± 0,16	1,69 ± 0,13	1,39 ± 0,10	3,10 ± 0,10	2,19 ± 0,12	1,73 ± 0,28
22-F1	2,66 ± 0,08	1,92 ± 0,08	1,31 ± 0,08	2,86 ± 0,19	2,12 ± 0,46	1,51 ± 0,19
22-F2	2,59 ± 0,13	1,85 ± 0,13	1,24 ± 0,13	2,77 ± 0,04	2,03 ± 0,04	1,42 ± 0,04
22-G1	2,62 ± 0,10	1,88 ± 0,10	1,27 ± 0,10	2,77 ± 0,21	2,03 ± 0,21	2,03 ± 0,21
22-H1	2,60 ± 0,13	1,86 ± 0,13	1,25 ± 0,13	2,78 ± 0,04	2,04 ± 0,04	1,43 ± 0,04
22-I1	2,68 ± 0,08	1,94 ± 0,08	1,33 ± 0,08	2,86 ± 0,05	2,12 ± 0,05	1,51 ± 0,05
22-I2	2,78 ± 0,23	2,04 ± 0,23	1,43 ± 0,23	2,89 ± 0,04	2,15 ± 0,04	1,54 ± 0,04
23-B1	2,19 ± 0,17	1,28 ± 0,14	ILC	2,70 ± 0,23	2,01 ± 0,13	0,60 ± 0,12
23-B2	2,65 ± 0,36	1,43 ± 0,32	0,12 ± 0,27	2,47 ± 0,24	1,30 ± 0,13	0,02 ± 0,11
23-G2	2,26 ± 0,20	1,59 ± 0,07	0,25 ± 0,06	2,88 ± 0,11	2,30 ± 0,07	0,83 ± 0,06
23-H1	1,72 ± 0,20	0,83 ± 0,13	ILC	2,69 ± 0,35	1,41 ± 0,08	0,40 ± 0,06

24-D1	2,32 ± 0,33	1,02 ± 0,25	1,03 ± 0,22	2,56 ± 0,22	1,54 ± 0,18	1,58 ± 0,19
24-D2	2,22 ± 0,22	0,98 ± 0,08	1,00 ± 0,09	2,42 ± 0,20	1,46 ± 0,22	1,49 ± 0,23
24-I1	1,80 ± 0,24	0,58 ± 0,08	0,58 ± 0,07	2,63 ± 0,19	1,17 ± 0,06	1,23 ± 0,06
24-I2	2,38 ± 0,03	1,46 ± 0,31	1,16 ± 0,29	2,78 ± 0,31	1,55 ± 0,56	1,25 ± 0,53
22-F4	2,43 ± 0,12	1,69 ± 0,12	1,08 ± 0,12	2,69 ± 0,09	1,95 ± 0,09	1,34 ± 0,09
23-B3	2,52 ± 0,29	1,34 ± 0,17	ILC	2,86 ± 0,10	2,00 ± 0,07	0,59 ± 0,06
23-H2	2,41 ± 0,16	1,34 ± 0,06	1,05 ± 0,06	2,82 ± 0,12	1,97 ± 0,10	1,62 ± 0,07
23-D1	2,53 ± 0,26	1,52 ± 0,11	1,13 ± 0,08	2,99 ± 0,05	2,54 ± 0,02	2,15 ± 0,01
23-D2	2,11 ± 0,09	1,35 ± 0,06	0,95 ± 0,03	2,87 ± 0,04	2,62 ± 0,06	2,27 ± 0,07
23-E1	2,45 ± 0,26	1,19 ± 0,08	0,82 ± 0,07	2,81 ± 0,18	2,25 ± 0,15	1,57 ± 0,31
23-E2	2,42 ± 0,13	1,45 ± 0,02	1,07 ± 0,01	2,93 ± 0,08	2,50 ± 0,03	2,13 ± 0,04
Manuka	1,12 ± 0,06	1,04 ± 0,11	1,05 ± 0,12	1,08 ± 0,08	1,89 ± 0,10	1,95 ± 0,10

\* ILC Inferior al límite de cuantificación.

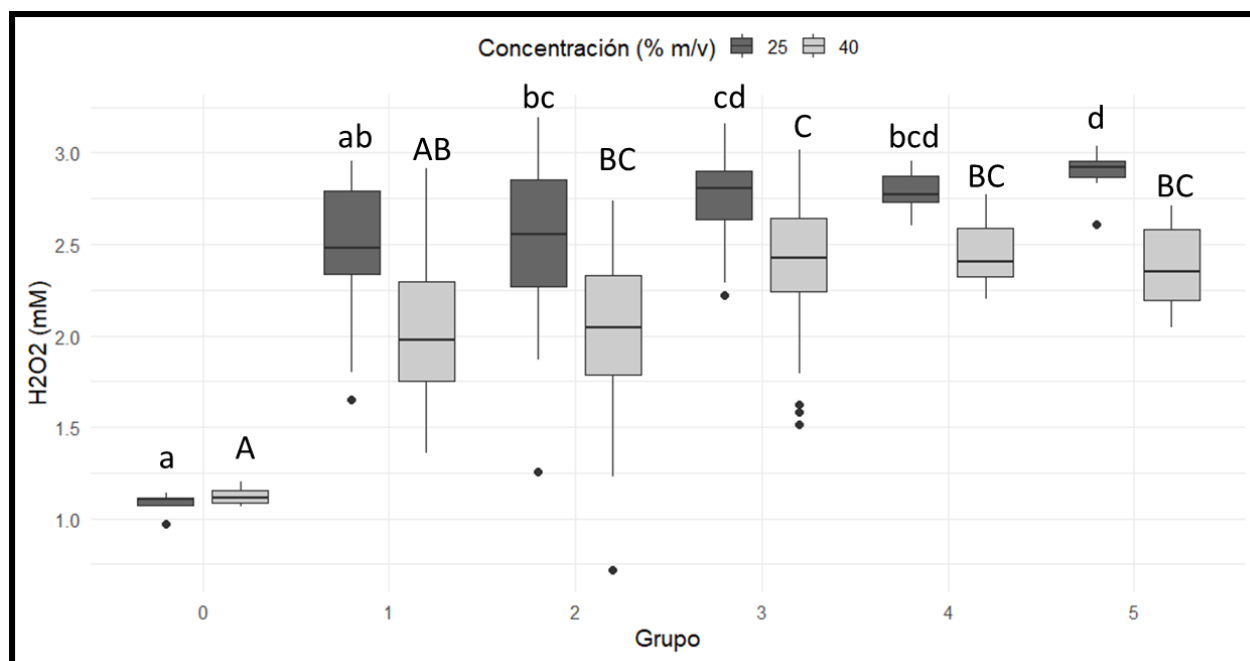


Figura 4.7. Boxplots de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por Grupos: 0 corresponde a miel de Manuka, 1 - Poliflorales, 2 - *B. salicifolius*, 3 - *S. buxifolia*, 4 - *T. asutralis*, 5 - *Eucaliptus* sp.. A tiempo 0 y dos concentraciones: 25 % y 40 % p/v. Letras distintas indican diferencias significativas dentro de la misma concentración de miel ( $p < 0,05$ ; Dunn-Holm).

Para visualizar los cambios en los tres tiempos evaluados, en la Figura 4.8 se destacan las muestras que presentaron mayor estabilidad (con una disminución de la concentración inicial  $\leq 30$  %): del grupo 2 las mieles 24-E1, 24-G1 y 23-F2, y del grupo 1: 24-J1. En contraste, las muestras menos estables (con  $\geq 95$  % de disminución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inicial) fueron: 22-A1 y 23-A1 del grupo 1, 23-G1 del grupo 2 y 23-B2 del grupo 3.

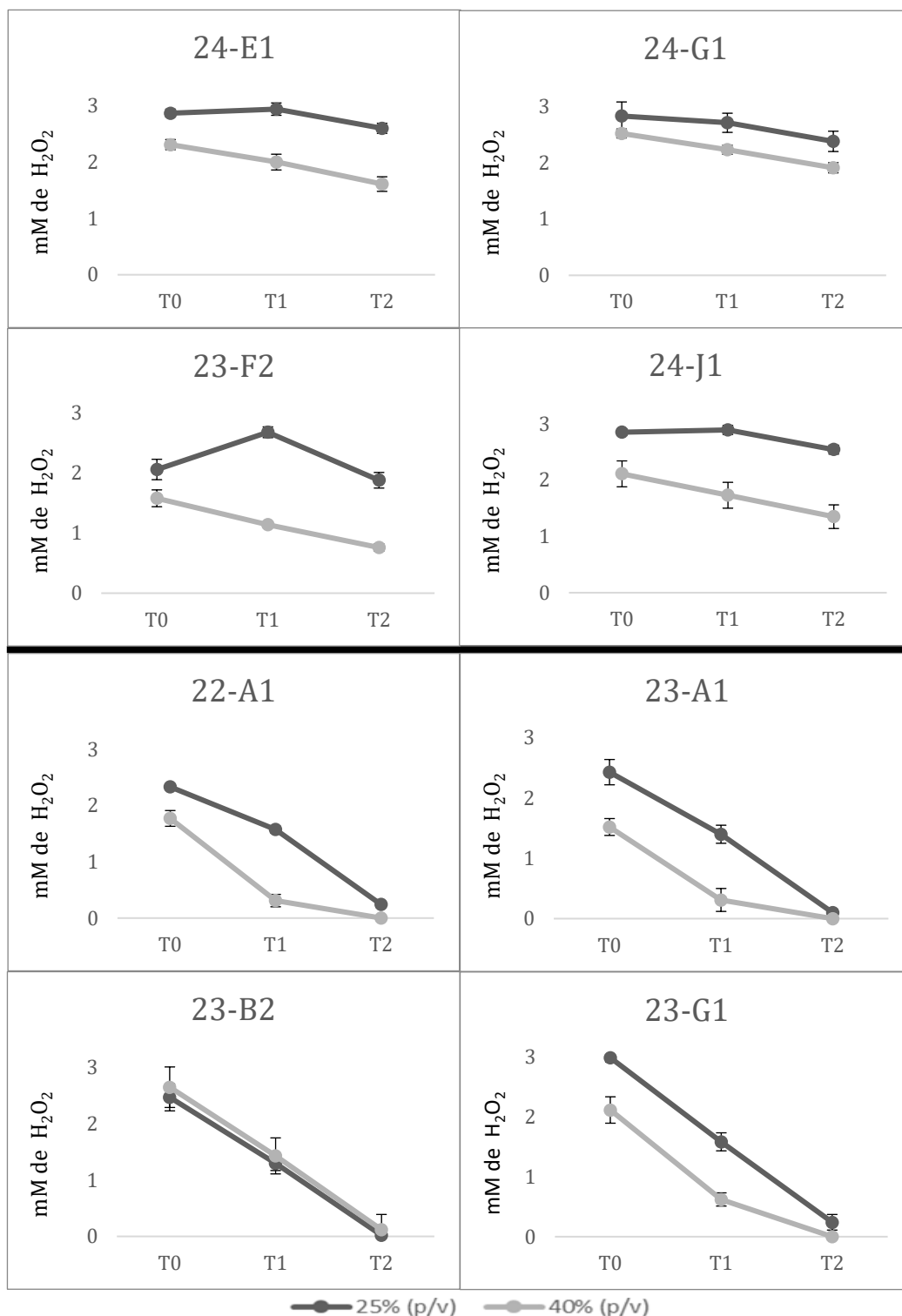


Figura 4.8. Evolución de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en muestras de miel más y menos estables. Cada gráfico representa la variación de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a dos concentraciones de miel a lo largo del tiempo: T0 (30 min), T1 (4 h) y T2 (6 h). Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

## 4.6. Estudio de actividad antimicrobiana

Para evaluar el potencial antimicrobiano de las mieles producidas en la región, se analizaron todas las muestras correspondientes a las cosechas 2022 y 2023 durante el año 2023, y las de la cosecha 2024 durante el año 2024, Además, se incluyó en el análisis una muestra comercial de miel de Manuka, utilizada como referencia para posteriores comparaciones.

### 4.6.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Microbicida

Los resultados de MIC y MMC sobre: *E.coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 15422, *S. aureus* ATCC 6538P y *C. albicans* ATCC 101231, correspondientes a las muestras cosechadas en 2022, 2023 y 2024 se muestran en las Figuras 4.9 a 4.11.

Como referencia se empleó la miel de Manuka, que mostró valores de MIC y MMC de 6,65 % (p/v) frente a *E. coli* y *S. aureus*; de 13,3 % (p/v) frente a *P. aeruginosa*; y de 53,3 % (p/v) tanto para MIC como para MMC en el caso de *C. albicans*.

Con respecto a los resultados de actividad antimicrobiana frente a *A. brasiliensis* ATCC 16404, ninguna miel produjo inhibición del crecimiento fúngico a las concentraciones evaluadas.

En cuanto a las mieles cosechadas en el 2022 todas evidenciaron actividad inhibitoria frente a las bacterias evaluadas (Figura 4.9). Frente a *E. coli*, once muestras (22-A1, 22-B2, 22-C2, 22-D1, 22-E1, 22-F1, 22-F2, 22-G1, 22-H1, 22-I1 y 22-I2) presentaron una MIC de 13,3 % (p/v), mientras que cinco (22-B1, 22-C1, 22-F3, 22-F4 y 22-F5) fueron menos eficientes, con MIC = 53,3 % (p/v). Entre estas, 22-B1, 22-F3, 22-F4 y 22-F5 no mostraron actividad microbicida en las concentraciones evaluadas.

Frente a *P. aeruginosa*, los valores de MIC oscilaron entre 13,3 % y 53,3 % (p/v). En cuatro muestras (22-B2, 22-C1, 22-F4 y 22-I1), la MIC coincidió con la MMC en la concentración 13,3 % (p/v), lo que indica una mayor actividad inhibitoria que las muestras: 22-F2, 22-G1 y 22-H1 sin MMC  $\leq$  53,3 % (p/v).

Frente a *S. aureus*, la mayoría de las muestras del 2022 presentaron MIC de 13,3 % (p/v). La excepción fue 22-F3, con MIC de 53,3 % (p/v) y sin actividad microbicida. En

total, nueve mieles (22-A1, 22-B1, 22-B2, 22-C2, 22-E1, 22-F1, 22-F2, 22-F5 y 22-H1) mostraron MIC de 13,3 % (p/v) y MMC de 53,3 % (p/v).

Con respecto a la actividad frente a *C. albicans*, sólo tres muestras (22-A1, 22-B1 y 22-E1) evidenciaron inhibición a una MIC de 53,3 % (p/v), sin observarse actividad microbicida en las concentraciones evaluadas.

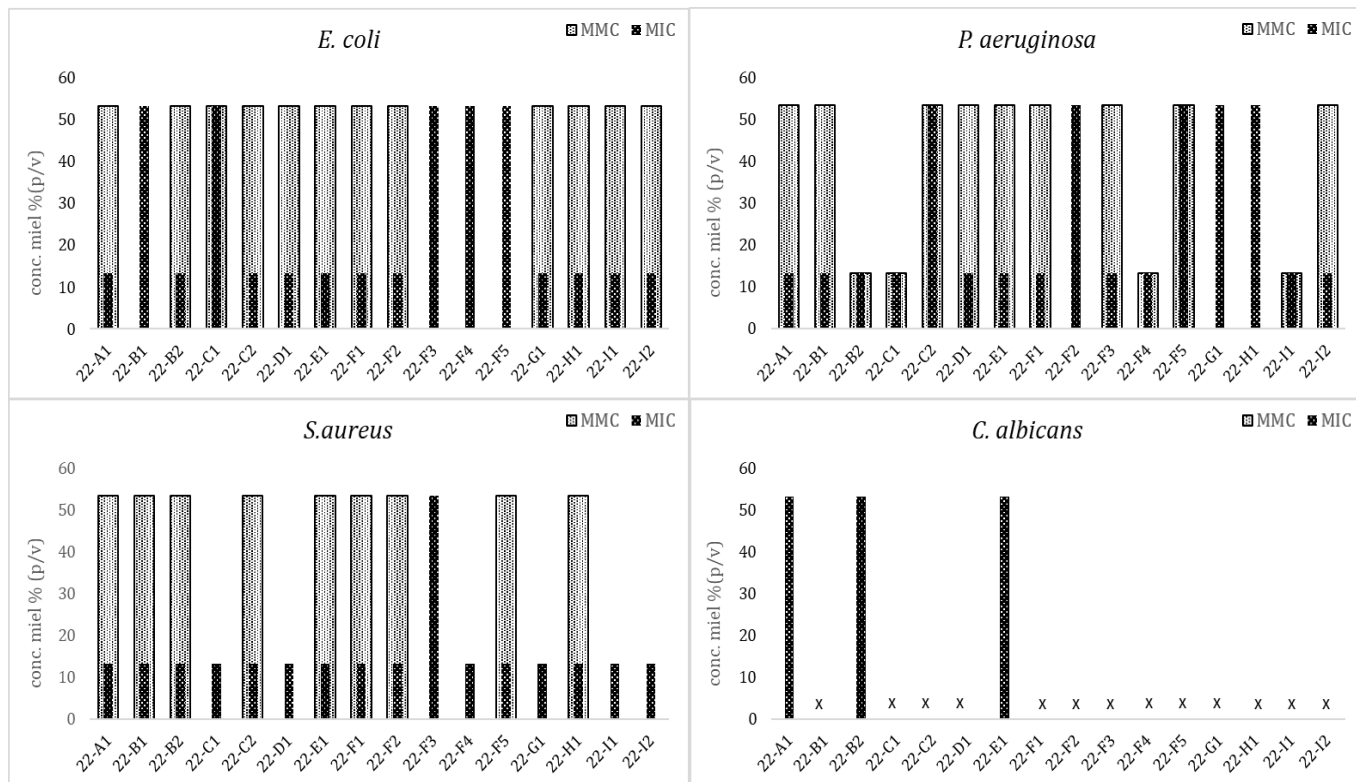


Figura 4.9. Resultados de la actividad antimicrobiana de mieles correspondientes a la cosecha 2022. Barras en gris representan resultado de MMC y en negro MIC, X = no presenta actividad inhibitoria a las concentraciones evaluadas.

En la Figura 4.10 se muestra la actividad de las mieles cosechadas en el 2023 con efecto sobre las tres bacterias. Frente a *E. coli*, los valores de MIC y MMC se ubicaron mayoritariamente en 53,3 % (p/v), con excepción de la muestra 23-F1, que evidenció mayor actividad antimicrobiana (MIC y MMC de 26,7 % (p/v)). En contraste, 22-B1, 23-E2 y 23-F2 no mostraron actividad microbicida a las concentraciones evaluadas ( $\leq 53,3$  % p/v).

La actividad inhibitoria frente a *P. aeruginosa* se registró a las concentraciones de 26,7 - 53,3 % (p/v) de miel. Las muestras 23-A1, 23-B2, 23-B3, 23-F1, 23-F2 y 23-H2 presentaron MIC de 26,7 % (p/v), de las cuales 23-B2, 23-F2 y 23-H2 tuvieron mayor

actividad antimicrobiana (MMC = 26,7 % (p/v). El resto de las muestras registró tanto MIC como MMC de 53,3 % (p/v).

Frente a *S. aureus*, la mayoría de las muestras del 2023 presentaron MIC de 53,3 % (p/v). La excepción fue la muestra 23-F1, que mostró MIC menor a 26,7 % (p/v). En cuanto a la actividad microbicida, solamente la muestra 23-D2 se destacó por presentar coincidencia entre MIC y MMC a 53,3 % (p/v). Por otro lado, las muestras del 2023 no presentaron efecto microbicida frente a *C. albicans* a las concentraciones evaluadas. No obstante, si se detectó efecto estasis de las mieles 23-A1, 23-B1, 23-D1, 23-D2, 23-E1, 23-E2, 23-F1, 23-F2 y 23-H2, todas ellas con un valor de MIC de 53,3 % (p/v).

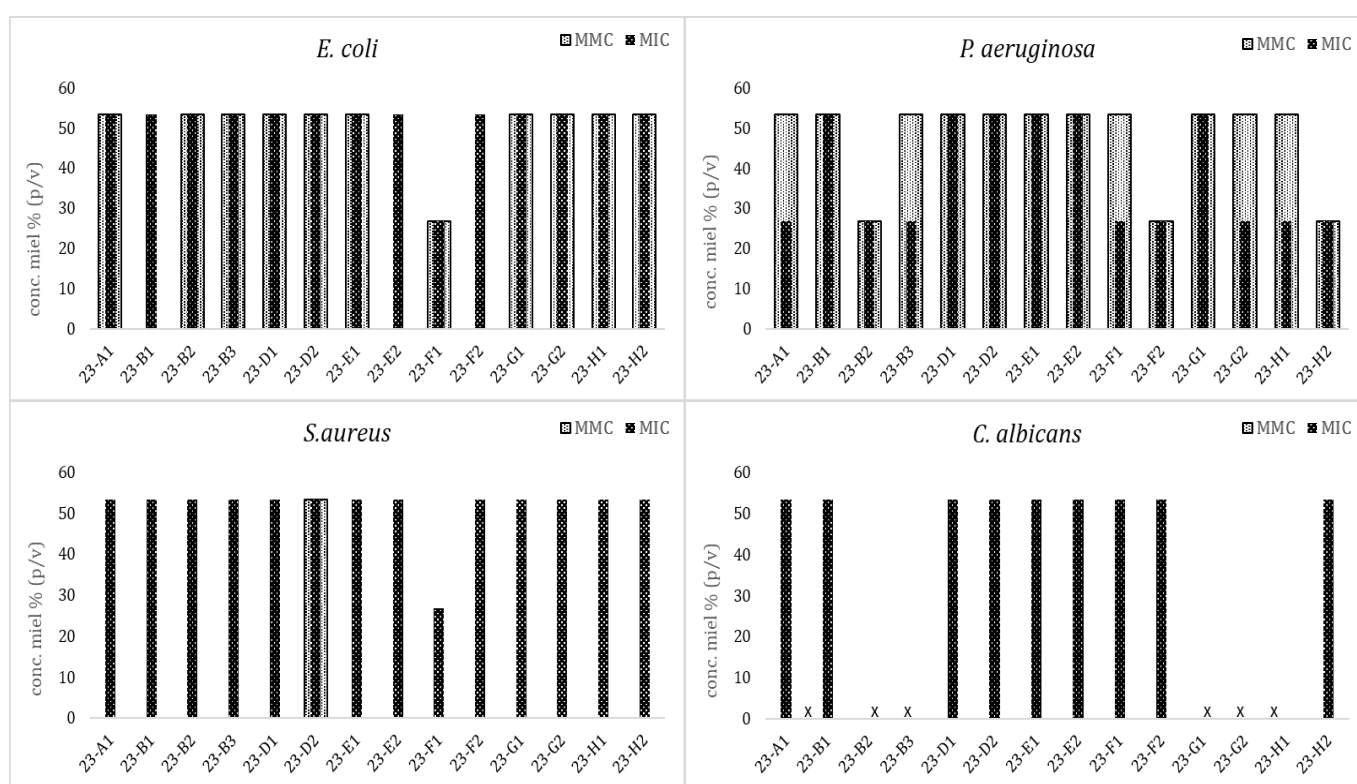


Figura 4.10. Resultados de la actividad antimicrobiana de mieles correspondientes a la cosecha 2023. Barras en gris representan resultado de MMC y en negro MIC, X = no presenta actividad inhibitoria a las concentraciones evaluadas.

Las mieles de la cosecha 2024 mostraron actividad inhibitoria frente a los cuatro microorganismos, con excepción de la muestra 24-I2, que no tuvo efecto sobre *C. albicans* (Figura 4.11). Los resultados frente a *E. coli*, fueron similares al registrado en las cosechas del 2022 y 2023: la mayoría de las muestras presentó MIC y MMC de 53,3 % (p/v), mientras que 24-E1, 24-E2 y 24-F6 dieron como resultado de MIC y MMC = 26,7 % (p/v).

La MIC frente a *P. aeruginosa* en la cosecha 2024 fue, en general, menor a la observada en 2023. De las 14 mieles analizadas, seis presentaron valores coincidentes de MIC y MMC de 26,7 % (p/v). Se destacan las muestras 24-B2 y 24-B3, con efecto inhibitorio a 13,3 % (p/v) y valores de MMC = 53,3 % y 26,7 % (p/v), respectivamente. En contraste, la muestra 24-F2 resultó ser la menos eficiente, con MIC 53,3 % (p/v) y sin efecto microbicida ( $\leq 53,3$  % (p/v)).

Los resultados frente a *S. aureus* de MIC fueron de 26,7 % y 53,3 % (p/v). Las mieles más efectivas fueron 24-E1, 24-E2, 24-F6, 24-I1 y 24-I2, que presentaron misma MIC y MMC a 26,7 % (p/v) de miel.

*C. albicans* se mostró particularmente más sensible a las mieles de la cosecha 2024, siendo la muestra 24-I2 la única que no presentó actividad frente a la levadura. Las muestras 24-B2, 24-B3, 24-D1, 24-E1, 24-F1, 24-F2, 24-F6, 24-G1 y 24-J1 mostraron coincidencia entre los resultados de MIC y MMC en 53,3 % (p/v), mientras que el resto de las muestras presentó únicamente efecto inhibitorio a 53,3 % (p/v).

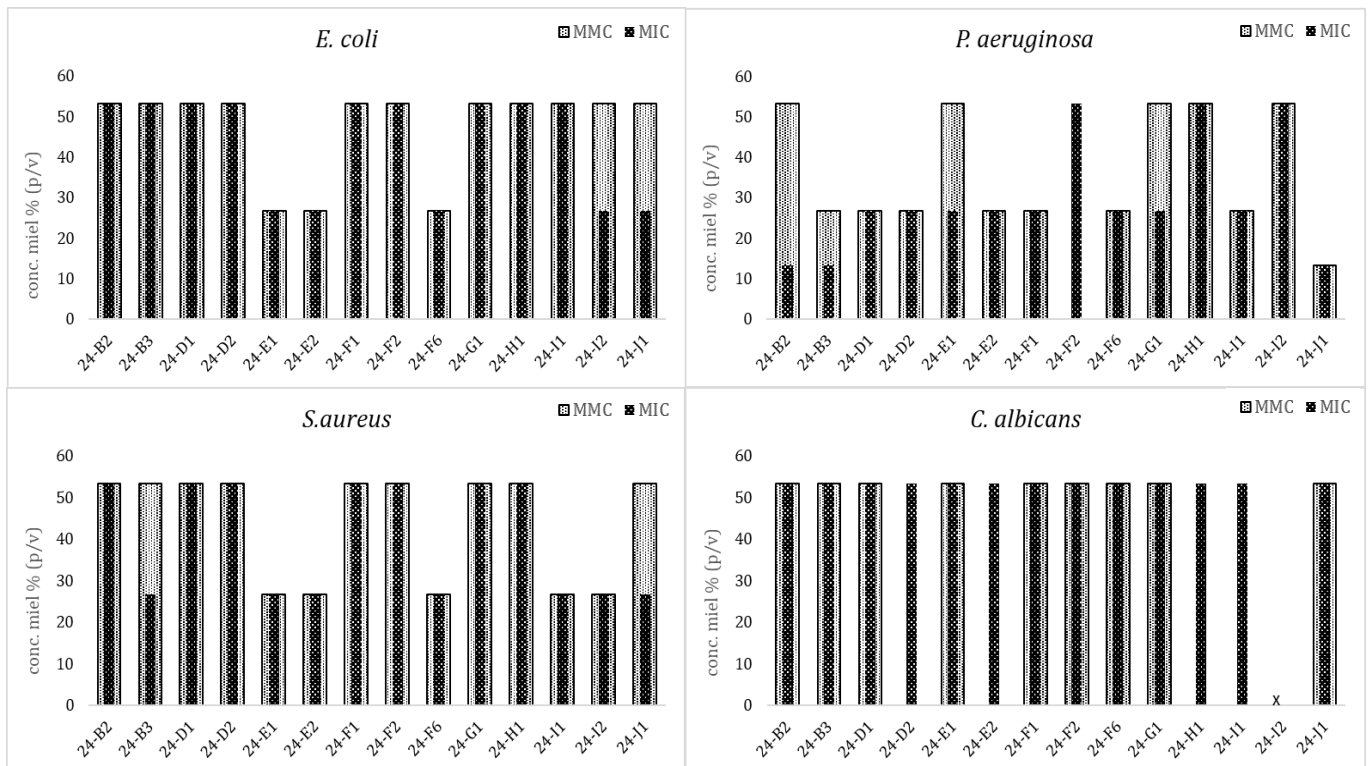


Figura 4.11. Resultados de la actividad antimicrobiana de mieles correspondientes a la cosecha 2024. Barras en gris representan resultado de MMC y en negro MIC, X = no presenta actividad inhibitoria a las concentraciones evaluadas.

Además, con el objetivo de explorar como influye la composición del polen y/o el año de cosecha en la actividad antimicrobiana, se utilizó el método de partición recursiva (árbol de clasificación), como se explicó en Metodología (Anexo 3). En la Tabla 4.8 se resume el desempeño de los modelos generados para actividad inhibitoria y microbicida.

Con respecto a los modelos generados en base a la actividad inhibitoria para *S. aureus* (modelo IC\_S), las cosechas 2022 y 2024 se asociaron con una mayor inhibición en comparación con 2023 ( $p < 0,001$ ). Dentro de este grupo, las muestras de 2022 muestran una tendencia a mayor inhibición aquellas que contienen  $\geq 2$  % de polen de *Lotus*. En el caso de *E. coli* (IC\_E), los resultados indicaron que contenidos bajos de polen de Papilionoideae ( $< 1,3$  %) y de *Brassicaceae* sp. ( $< 2,7$  %) se asociaron a mayor inhibición de este microorganismo. Asimismo, se observó una tendencia a mayor actividad cuando *Gleditsia* estuvo por debajo de 1,6 %. El modelo de *P. aeruginosa* (IC\_P), identificó un mayor efecto inhibitorio en muestras con más de 2,5 % de polen de *T. australis*, junto con una tendencia similar en aquellas con  $< 1,1$  % de *Eucalyptus*. En cuanto a *C. albicans* (IC\_C), las cosechas 2023 y 2024 se relacionaron con mayor inhibición ( $p < 0,01$ ), asociada en particular a un menor contenido de polen de *Eryngium*.

En cuanto a la actividad microbicida, frente a *S. aureus* (MC\_S) el modelo muestra que la cosecha 2024 presentó un efecto significativamente mayor ( $p < 0,001$ ), con una asociación secundaria y más débil ( $p = 0,15$ ) a un menor contenido de *Gleditsia* ( $< 1,6$  %). En cuanto a *E. coli* (MC\_E), un contenido superior al 46,1 % de polen de *B. salicifolius* se vinculó con mayor actividad microbicida ( $p < 0,01$ ), mientras que también se detectó una tendencia ( $p = 0,17$ ) cuando *Gleditsia* está por debajo del 1 %. En cuanto a *P. aeruginosa* (MC\_P), se puede observar una leve tendencia a mayor efecto en muestras con  $> 6,3$  % de *B. salicifolius* complementada por un menor contenido de *Myrtaceae* ( $< 2,8$  %), sin embargo, el desempeño del modelo fue limitado. Por el contrario, el modelo generado frente a *C. albicans* mostró el mejor ajuste, donde la cosecha 2024 se asoció con el mayor efecto microbicida ( $p < 0,001$ ). Adicionalmente, se observó una tendencia a que porcentajes elevados de *B. salicifolius* ( $> 50,2$  %) en el perfil polínico incrementarían la actividad.

Tabla 4.8. Resumen de resultados del análisis de árboles de partición sobre variables año de cosecha y composición polínica asociadas a actividad inhibitoria (IC) y microbicida (MC). E: *E.coli*, S: *S.aureus*, P: *Paeruginosa* y C: *C.albicans*.

<b>Modelo</b>	<b>Split 1 (p-valor)</b>	<b>Split 2 (p-valor)</b>	<b>Split 3 (p-valor)</b>
<b>IC_S</b>	Cosecha = 22 y 24 (4,9E-4)	Cosecha =22 (0,04)	<i>Lotus</i> ≥ 2 (0,06)
<b>IC_E</b>	Papilionoideae < 1,3 % (3,1E-4)	Brassicaceae ≤ 2,7 % (8,4 E-4)	<i>Gleditsia</i> < 1,6% (0,06)
<b>IC_P</b>	<i>T. australis</i> ≥ 2,5 % (0,001)	<i>Eucaliptus</i> sp. < 1,1% (0,01)	
<b>IC_C</b>	Cosecha =23 y 24 (2,1E-4)	<i>Eryngium</i> < 1,1% (4,1E-4)	
<b>MC_S</b>	Cosecha = 2024 (1,8E-4)	<i>Gleditsia</i> < 1,6% (0,15)	
<b>MC_E</b>	<i>B. salicifolius</i> ≥ 46,1% (0,009)	<i>Gleditsia</i> < 1% (0,17)	
<b>MC_P</b>	<i>B. salicifolius</i> ≥ 6,3% (0,054)	Myrtacea < 2,8% (0,15)	
<b>MC_C</b>	Cosecha = 2024 (5,1E-6)	<i>B. salicifolius</i> ≥ 50,25 (0,16)	

#### 4.6.2 Evaluación del potencial antimicrobiano de volátiles

Para evaluar la posible actividad inhibitoria producida por compuestos volátiles de las mieles estudiadas frente a los microorganismos, se realizaron ensayos utilizando dos concentraciones diferentes de miel, con observaciones a las 24 y 48 horas de incubación. En ninguno de los casos se observó inhibición del crecimiento microbiano en comparación con el control sin miel. Es importante señalar que, la muestra de miel de Manuka, tampoco presentó efecto inhibitorio sobre el crecimiento microbiano en ninguna de las concentraciones ensayadas.

#### 4.6.3 Evaluación de la capacidad de inhibición de la formación de biofilms.

La capacidad de inhibir la formación de biofilms de *S. aureus* (Figura 4.12) y *P. aeruginosa* fue evaluada utilizando miel de Manuka y 15 muestras seleccionadas por haber mostrado actividad antimicrobiana (MIC y MMC) alta y baja, correspondientes a las tres cosechas, del 2022: 22-A1, 22-B2, 22-C1, 22-E1 y 22-F4), del 2023: 23-B2, 23-E2, 23-G1 y del 2024: 24-E1, 24-E2, 24-F1, 24-F6, 24-G1, 24-H1 y 24-J1.

Los resultados mostraron que la miel 22-C1 redujo significativamente la formación de biofilm de *S. aureus* respecto al basal a concentraciones de 53,3 y 26,7 % (p/v), alcanzando niveles de inhibición comparables a los observados para la miel de Manuka y a la absorbancia del control de medio estéril (Figura 13). En *P. aeruginosa*, la muestra 23-B2 presentó un comportamiento similar, con una marcada reducción de la biomasa en ambas concentraciones, también equiparable a la inhibición lograda por la miel de Manuka y el control.

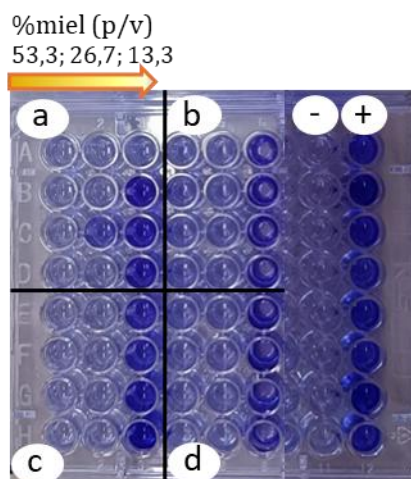


Figura 4.12. Ensayo de inhibición de biofilms de *S. aureus* con revelador cristal violeta. Las letras corresponden a las muestras evaluadas: (a) 23-B2; (b) 23-E2; (c) 24-E1; (d) 24-E2, además, (-) control de esterilidad y (+) control basal.

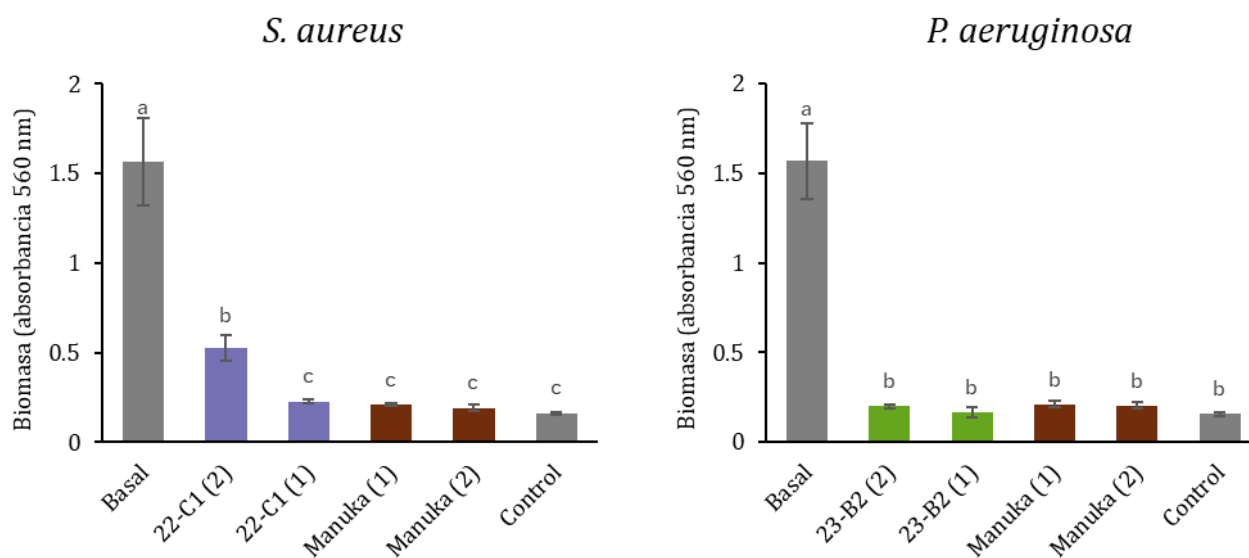


Figura 4.13. Inhibición de formación de biofilms bacterianos tratados con las mieles (22-C1, 23-B2, Manuka). Basal: biofilm sin tratamiento. Control: caldo estéril sin biofilm. Los números (1) y (2) corresponden a las concentraciones de miel evaluadas 53,3% y 26,7 % (p/v), respectivamente. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (Anova, test de Tukey  $p \leq 0,05$ ).

Los resultados del porcentaje de inhibición frente a *S. aureus* de las 15 muestras evaluadas se presentan en la Figura 4.14. A concentraciones inferiores a 26,7 % (p/v) no se detectó efecto inhibitorio. En cambio, 53,3 % (p/v), todas las mieles, excepto la muestra 24-G1, presentaron porcentajes de inhibición iguales o superiores al 70 %. Además, 7 de las 15 muestras (22-A1, 22-B2, 22-C1, 22-E1, 24-F6, 24-H1 y 24-J1) exhibieron valores comparables al de la miel de Manuka (96,7 %). A la concentración intermedia de 26,7 % (p/v), la respuesta fue más heterogénea; no obstante, las muestras 22-A1, 22-B2, 22-C1, 22-E1, 23-E2, 24-E1, 24-F1, 24-F6, 24-J1 y 24-E2 mantuvieron capacidad inhibitoria comparable a Manuka mientras otras evidenciaron una marcada disminución, con porcentajes inferiores al 50 %, como en los casos de: 23-B2, 23-G1, 24-G1 y 24-H1.

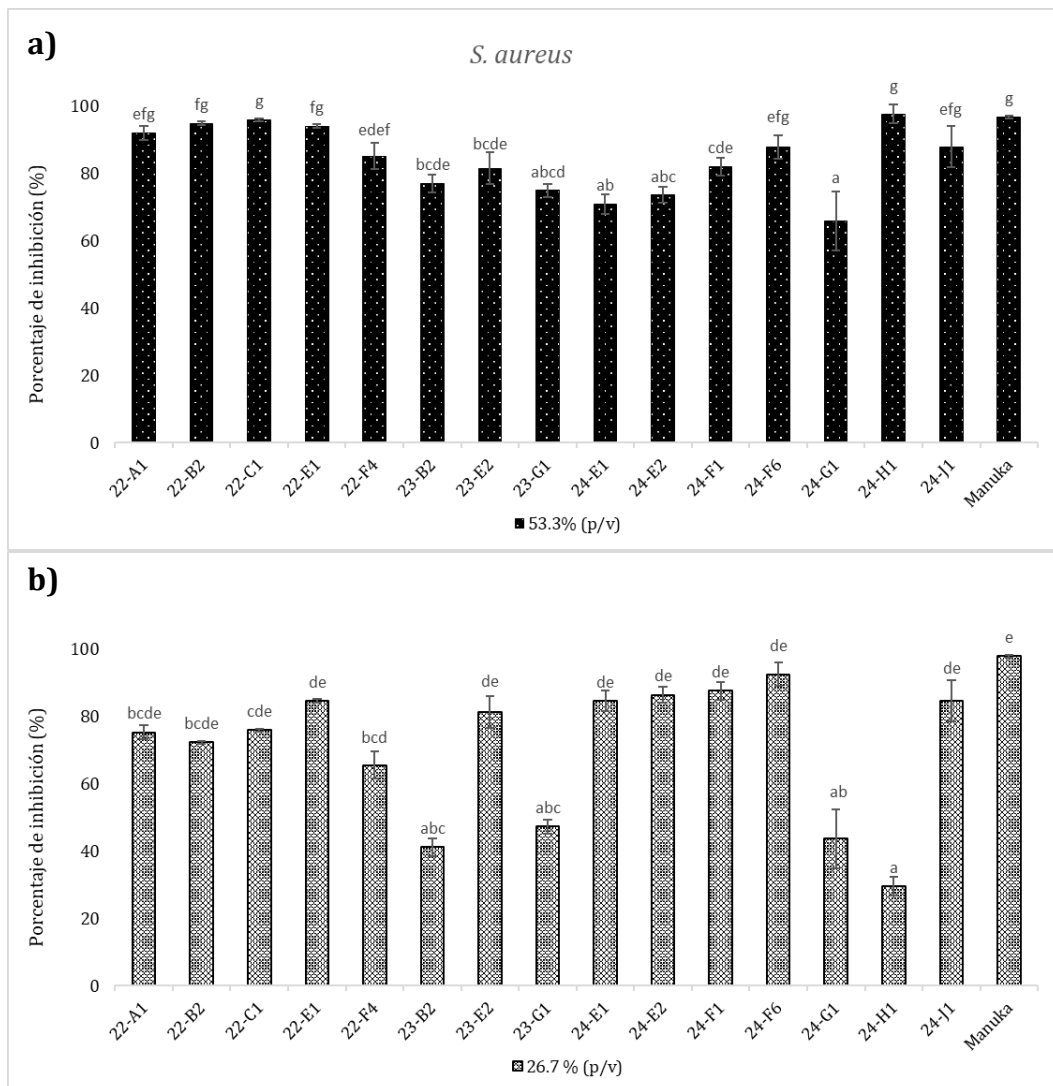


Figura 4.14. Inhibición de la formación de biofilms de *S. aureus*. En la figura a) se muestran los porcentajes de inhibición de mieles a 53.3 % (p/v) y en b) de mieles al 26.7% (p/v). Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

Las quince muestras presentaron porcentajes de inhibición elevados frente a *P. aeruginosa* a las concentraciones de 53,3 % y 26,7 % (p/v) (Figura 4.17). A 53,3 % (p/v), las muestras 24-J1, 24-H1, 24-F1, 24-F6 y 24-E1 exhibieron una actividad comparable a la de la miel de Manuka, mientras que 23-E2 y 23-G1 presentaron porcentajes de inhibición aún mayores, comparables a los controles de peróxido de 2 y 3 mM.

En la concentración intermedia de 26,7 % (p/v), se mantuvieron porcentajes de inhibición altos en varias muestras, observándose valores comparables a los de la miel de Manuka y a los controles de peróxido en las muestras 23- B2, 23- E2, 23-G1, 24-E1, 24-E2, 24-F1, 24-F6, 24-G1 y 24-J1, otras mieles evidenciaron una disminución en su eficacia, como 24-H1, que presentó un porcentaje de inhibición del 73,6 %.

En la concentración más baja a 13,3 % (p/v), la respuesta fue más variable, las muestras: 23-G1, 24-E1, 24-E2, 24-F1, 24-F6, 24-G1, 24-H1 y 24-J1 mostraron actividad inhibitoria comparable a la de la miel de Manuka (87,1 %), mientras que otras tuvieron valores marcadamente inferiores, por debajo del 30 %, como 22-E1, 22-F4 y 23-B2, resultados comparables al control de peróxido a 1 mM.

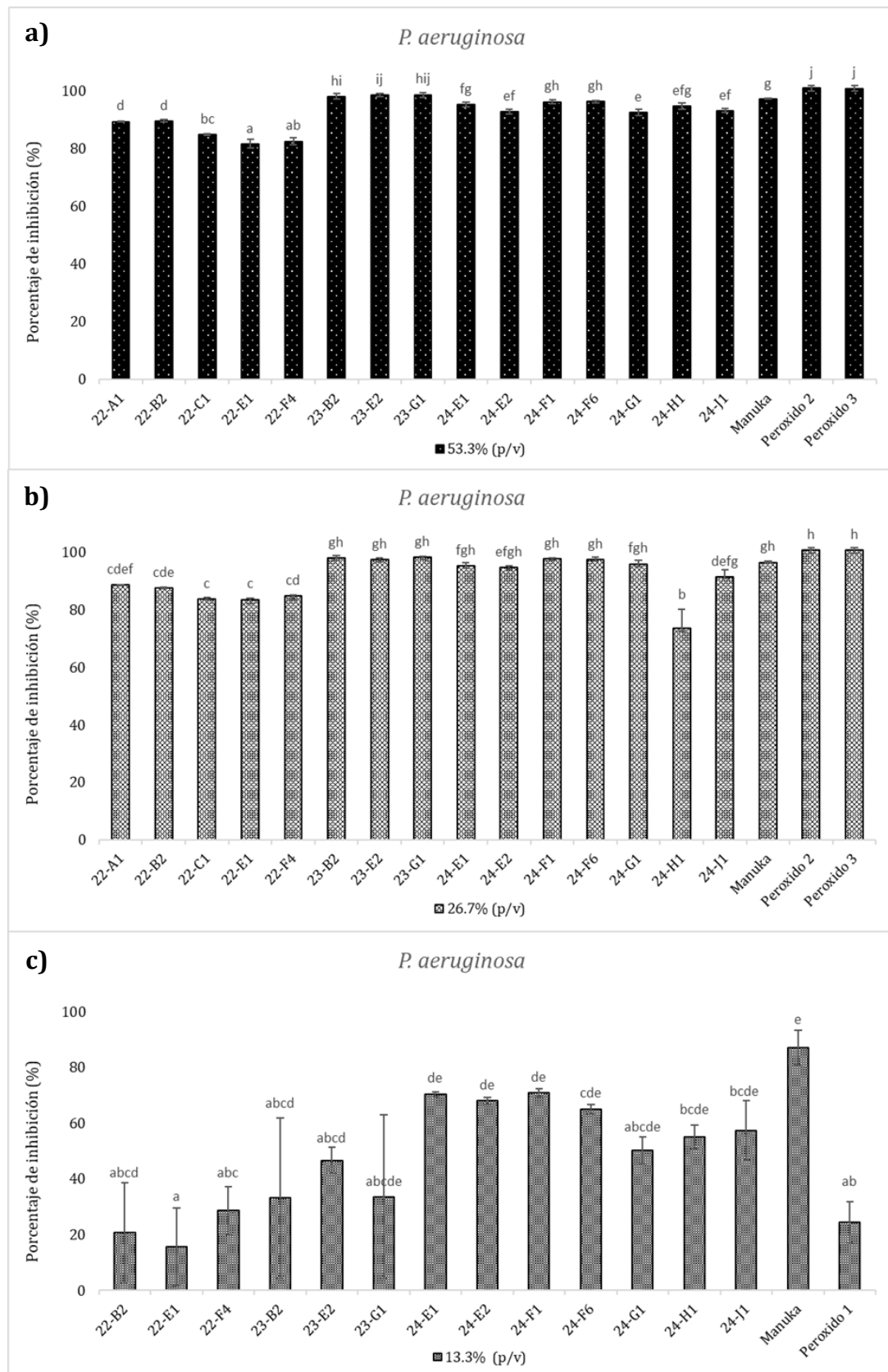


Figura 4.15. Inhibición de la formación de biofilms de *P. aeruginosa*. En la figura a) se muestran los porcentajes de inhibición de mieles a 53,3 %(p/v), en b) de mieles al 26,7%(p/v) y en c) de las mieles que tuvieron efecto a 13,3% (p/v). Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

La Concentración Inhibitoria de Biofilm Mínima (CIBM) se muestra en la Tabla 4.7. Frente a *P. aeruginosa*, varias mieles lograron alcanzar la CIBM en concentraciones intermedias, principalmente las del grupo 2 (*B. salicifolius*), así como también las muestras: 23-B2 (G3), 24-J1 (G1) y 23-E2 (G5) con la misma concentración = 26.7 %p/v. En contraste, la muestra 24-H1 presentó una CIBM más elevada, mientras que otras, como las del grupo 1: 22-A1, 22-C1 y 22-E1 y 22-B2 del grupo 2, no alcanzaron el umbral del 90 % de inhibición en las concentraciones evaluadas. En el caso de *S. aureus*, la inhibición fue menor, la mayoría de las mieles que alcanzaron la CIBM lo hicieron a 53,3 % (p/v) como el caso de 22-A1, 22-C1, 22-E1, 22-B2 y 24-H1. La única excepción fue la muestra 24-F6, que presentó un valor de CIBM más bajo.

Por otra parte, la miel de Manuka presentó una CIBM notablemente menor frente a *S. aureus* (6,65 % p/v), en comparación con las mieles de Montes del Queguay. En el caso de *P. aeruginosa*, el valor de CIBM fue de 26,7 % (p/v), equivalente al de varias de las muestras locales.

Tabla 4.7. Concentración Inhibitoria de Biofilm Mínima (CIBM) sobre *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

Grupo	Muestra	CIBM % (p/v)	
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
1	22-A1	NP	53,3
1	22-C1	NP	53,3
1	22-E1	NP	53,3
1	24-J1	26,7	NP
2	22-B2	NP	53,3
2	23-G1	26,7	NP
2	24-E1	26,7	NP
2	24-E2	26,7	NP
2	24-F1	26,7	NP
2	24-F6	26,7	26,7
2	24-G1	26,7	NP
2	24-H1	53,3	53,3
3	23-B2	26,7	NP
4	22-F4	53,3	NP
5	23-E2	26,7	NP

NP = no presenta  $\geq 90$  % actividad inhibitoria a las concentraciones evaluadas.

#### 4.6.4 Análisis de correlación entre actividad antimicrobiana y parámetros fisicoquímicos y químicos de muestras seleccionadas.

Con el objetivo de explorar la posible relación entre la actividad antimicrobiana y parámetros fisicoquímicos (acidez, pH, fenoles y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), se elaboró un mapa de correlación a partir de las 15 muestras seleccionadas y evaluadas frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Anexo 4).

A partir de la Figura 4.16 se confirma una asociación positiva entre los indicadores de actividad antimicrobiana (IC, MC e InBiof), muestras con mayor efecto inhibitorio (IC) tienden a mayor efecto microbicida (MC) y/o actividad antibiofilm (InBiof), dependiendo del microorganismo evaluado. En particular, se observó una correlación positiva entre el efecto inhibitorio y microbicida frente a *P. aeruginosa* (IC\_P - MC\_P  $r = 0,632$ ;  $p = 1,77 \times 10^{-4}$ ) y *S. aureus* (IC\_S - MC\_S  $r = 0,413$ ;  $p = 0,0233$ ).

Asimismo, se observó un patrón consistente entre las respuestas frente a ambos microorganismos: las mieles con mayor inhibición de *P. aeruginosa* tendieron también a mostrar mayor inhibición de *S. aureus* (IC\_P e IC\_S;  $r = 0,54$ ;  $p = 2,1 \times 10^{-3}$ ). Además, el efecto inhibitorio frente a *S. aureus* se asoció con el efecto microbicida frente a *P. aeruginosa* (MC\_P e IC\_S  $r = 0,37$ ;  $p = 0,04$ ).

Al analizar el efecto inhibitorio de la formación de biofilm de *S. aureus* se confirma la relación positiva con la actividad de inhibición del crecimiento planctónico (InBiof\_S - IC\_S,  $r = 0,58$ ;  $p = 7,9 \times 10^{-4}$ ) y con el efecto microbicida (MC\_S,  $r = 0,46$ ;  $p = 0,01$ ). Sin embargo, la inhibición del biofilm de *P. aeruginosa* (InBiof\_P) no mostró asociaciones significativas con los demás indicadores analizados.

Entre los parámetros fisicoquímicos y los indicadores de actividad antimicrobiana se observaron asociaciones significativas: la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se correlacionó inversamente con la inhibición y el efecto microbicida frente a *P. aeruginosa* (IC\_P y MC\_P) y con la inhibición del crecimiento planctónico y del biofilm frente a *S. aureus* (IC\_S e InBiof\_S) ( $r = -0,417$  y  $-0,523$ ;  $p < 0,05$ ). El pH se asoció positivamente con la inhibición de biofilms de *P. aeruginosa* (InBiof\_P,  $r = 0,69$ ;  $p = 2,03 \times 10^{-5}$ ) e inversamente con InBiof\_S ( $r = -0,37$ ;  $p = 0,046$ ). En cuanto a fenoles totales, se registró una correlación positiva con IC\_P ( $r = 0,41$ ;  $p = 0,03$ ) y negativa con InBiof\_P ( $r = -0,51$ ;

$p = 0,004$ ). En cambio, la acidez no mostró correlaciones significativas con los indicadores de actividad antimicrobiana evaluados ( $p > 0,05$ ).

En cuanto a los parámetros fisicoquímicos, se observó una relación inversa marcada entre fenoles y pH ( $r = -0,80$ ;  $p = 1 \times 10^{-7}$ ). Además, el  $H_2O_2$  se asoció positivamente con el pH ( $r = 0,49$ ;  $p = 0,005$ ) y negativamente tanto con fenoles como con acidez ( $r = -0,628$ ;  $p < 0,001$ ; y  $r = -0,44$ ;  $p = 0,02$ , respectivamente). Por su parte, la acidez se correlacionó positivamente con los fenoles ( $r = 0,526$ ;  $p = 0,003$ ) y negativamente con el pH ( $r = -0,47$ ;  $p = 0,009$ ).

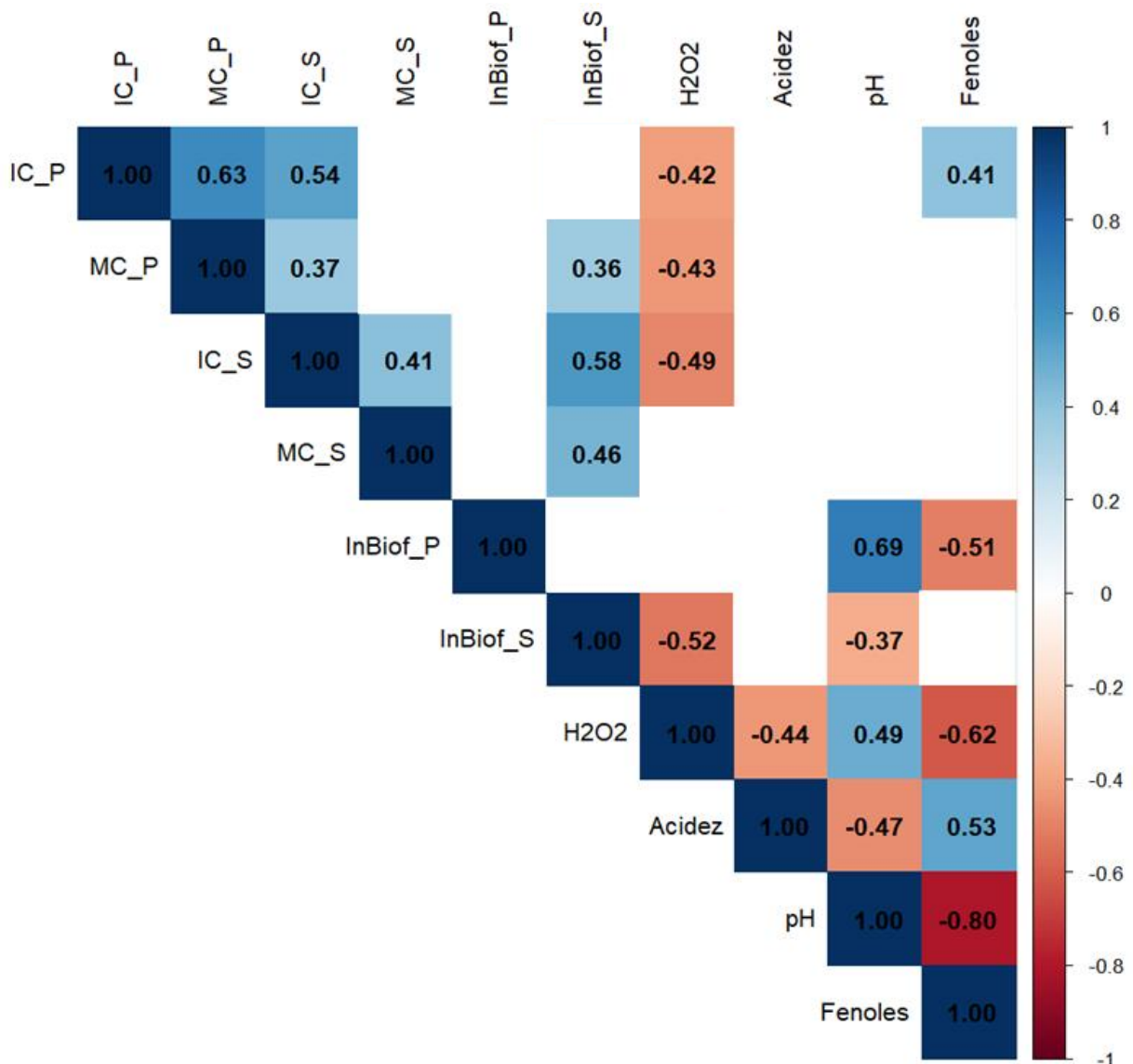


Figura 4.16. Mapa de calor de correlación entre las variables microbiológicas (MIC, MMC e inhibición de biofilm para *S. aureus* y *P. aeruginosa*) y los parámetros fisicoquímicos de 15 muestras de miel (acidez, pH, fenoles totales y producción de  $H_2O_2$ ). Los valores representan coeficientes de correlación de Pearson ( $p < 0,05$ ). La escala de color indica la magnitud y dirección de las correlaciones, desde negativas (rojo) hasta positivas (azul).

## 4.7. Simulación de digestión gastrointestinal *in vitro*

Con el fin de evaluar los posibles cambios en la actividad antimicrobiana y en los compuestos antioxidantes (TPC), se realizó una simulación de digestión *in vitro* sobre las mieles correspondientes a la cosecha 2024. Como resultado del ensayo, se obtuvo únicamente la fracción bioaccesible de las muestras, ya que la fracción insoluble o colónica fue despreciable: solo se observó un residuo insoluble mínimo, similar al control del proceso.

### 4.7.1 Determinación de TPC en fracciones bioaccesibles

La cuantificación de TPC después de la digestión simulada *in vitro* mostró un aumento significativo, alcanzando valores entre 770,0 y 1458,9 mg de ácido gálico/kg, en comparación con las muestras antes del proceso (denominadas “RAW” en esta tesis) que presentaron concentraciones entre 534,2 y 990,3 mg de ácido gálico/kg (Figura 4.17). Entre las muestras digeridas, 24-D1 se destacó por presentar el valor más elevado de TPC junto a 24-B3, 24-F1 y 24-G1. En contraste, en muestras como 24-D2, 24-F6 y 24-J1 el aumento del TPC tras la digestión fue visualmente menos evidente respecto a sus correspondientes muestras RAW.

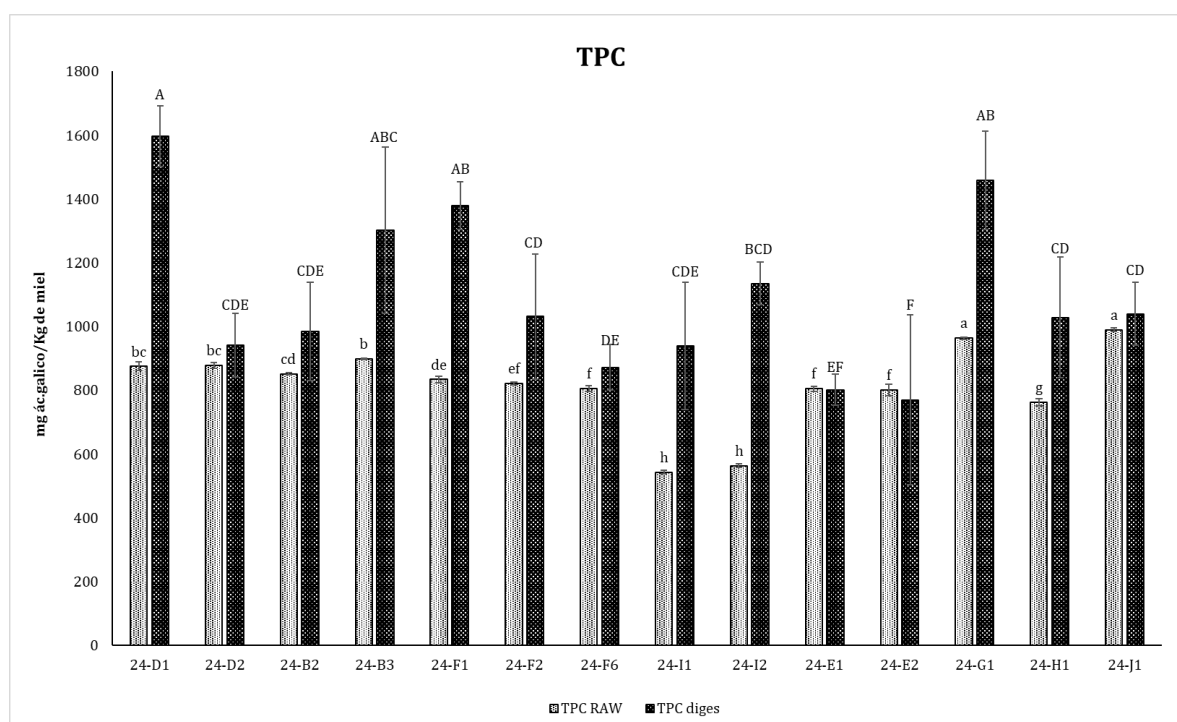


Figura 4.17. TPC en muestras de mieles “RAW” y fracciones bioaccesibles “diges”. Las barras de error indican el error estándar de la medida. Letras diferentes en mayúscula denotan diferencias significativas entre las fracciones bioaccesibles (Tukey,  $p < 0,05$ ) y letras diferentes en minúscula denotan diferencias significativas entre las mieles (Tukey,  $p < 0,05$ ).

#### 4.7.2 Actividad antimicrobiana de fracciones bioaccesibles: MIC y MMC

Las fracciones bioaccesibles se evaluaron utilizando el mismo protocolo aplicado a las muestras de mieles originales. Sin embargo, se pudo observar que la concentración inicial de las muestras digeridas fue considerablemente menor (6,7 % p/v) en comparación con las muestras de mieles originales, cuya concentración inicial fue de 53,3% (p/v). Está marcada diferencia en la concentración inicial podría ser un factor determinante en la ausencia de actividad antimicrobiana observada en las fracciones bioaccesibles frente a los cuatro microorganismos evaluados.

## 5. Discusión

### 5.1. Origen botánico de las mieles

El análisis melisopalínológico permitió relevar a la flora nativa de la región como principal fuente de néctar para la producción de estas mieles. El espectro polínico incluyó una amplia diversidad de tipos pertenecientes a familias nativas, entre ellas Anacardiaceae, Apiaceae, Asteraceae, Combretaceae, Euphorbiaceae, Myrtaceae, Polygonaceae, Ranunculaceae, Rhamnaceae y Sapindaceae. Dentro de este conjunto, se identificaron como especies predominantes: *Scutia buxifolia* (Rhamnaceae), *Blepharocalyx salicifolius* (Myrtaceae), otras Myrtaceae nativas (*Myrceugenia*, *Myrcianthes* y *Psidium*), y *Terminalia australis* (Combretaceae). Estos resultados confirman que las especies autóctonas desempeñan un papel fundamental en la dinámica del ecosistema y sugiere, además, que la actividad apícola podría contribuir positivamente a la preservación de la biodiversidad por polinización (Zapata et. al, 2025).

En relación con la clasificación botánica, aproximadamente el 52 % de las muestras analizadas presentaron un polen predominante, por lo que podrían denominarse “monoflorales” bajo el criterio basado en umbrales porcentuales de polen dominante como los de la Resolución Argentina N° 274/95. Sin embargo, estos umbrales no son universales y su aplicación requiere cautela, ya que el contenido polínico puede verse afectado por la biología floral de cada especie y por fenómenos de enriquecimiento (secundario, terciario o cuaternario), entre otras fuentes de variabilidad. Para una interpretación correcta del origen botánico, es necesario tener en cuenta, además, las características sensoriales y fisicoquímicas de la miel (Bryant & Jones, 2001; Jones & Bryant 2004; INTA, 2019).

En este contexto, la presencia de polen predominante en una proporción importante de las muestras refleja una marcada dependencia de las abejas hacia *B. salicifolius*, *T. australis*, *S. buxifolia*, Myrtaceae y *Eucalyptus sp.*, durante los períodos de colecta del estudio. Este patrón puede explicarse tanto por la abundancia estacional de las especies dominantes como por la mayor atracción que ejercen las flores que ofrecen mayores recompensas de néctar y polen sobre las abejas (Santos, 2020).

Teniendo en cuenta los porcentajes de composición polínica de todas las muestras de miel se obtuvo el dendrograma de agrupamiento jerárquico (Figura 4.5). La distribución de los grupos definidos por el análisis de conglomerados varió entre años, sugiriendo cambios interanuales en la oferta floral disponible. En particular, el grupo 1 conformado por diez muestras de las cuales siete corresponden a la cosecha 2022, se caracterizó por una composición claramente polifloral, con aportes relevantes de *B. salicifolius*, *S. buxifolia*, *Schinus* sp., *T. australis*, *Trifolium* sp. *Baccharis* sp. *Echium plantagineum*, *Erygium* sp., entre otros. Si bien la muestra 22-F3 presentó un perfil monofloral de Myrtaceae y, además, correspondió a una cosecha más tardía, se decidió incluirla dentro de este clúster para simplificar las comparaciones. Este grupo refleja la elevada riqueza botánica del área y sugiere que las abejas forrajeras utilizan diversos recursos florales para sostener la nutrición de la colonia (Abou-Shaara, 2014).

Por otra parte, trece muestras se agruparon por presentar un predominio marcado de *B. salicifolius* (Grupo 2), en las que esta especie superó el 40 % del contenido polínico total en todas las muestras. La representatividad de este grupo varió entre cosechas: en 2022 correspondió 12,5% de las muestras, aumentó en 2023 a 21,4% y alcanzó su mayor proporción en 2024, con 57,1% muestras. Este patrón sugiere una mayor contribución relativa de *B. salicifolius* como fuente de néctar en 2024, probablemente asociada a cambios interanuales en la disponibilidad floral.

Un tercer conjunto, el Grupo 3 estuvo conformado por catorce mieles que presentaron un promedio del 30 % de polen de *S. buxifolia*. Este grupo representó el 37,5% de las muestras en 2022, y el 28,6% tanto en 2023 como en 2024, lo que indica una presencia sostenida a lo largo de las cosechas. Sin embargo, pese a la representación importante de *S. buxifolia* en este grupo, solo dos muestras alcanzaron la categoría de “monoflorales”. Esto contrasta con lo observado para *B. salicifolius* en el Grupo 2, donde la mayoría de las mieles superaron el 45 % de polen requerido para dicha clasificación. Estas diferencias podrían relacionarse con variaciones en la oferta floral, la disponibilidad espacial y temporal de los recursos, o con patrones de forrajeo específicos

Además, solo tres muestras integraron el grupo de *T. australis* (G4), con un promedio del 67 % de su contenido polínico. Esta especie ribereña, típica de ambientes asociados

a cursos de agua (Brussa & Grela, 2007), estuvo presente sólo en las cosechas del 2022 y 2023 de las mieles analizadas.

El Grupo 5, compuesto por cuatro muestras, presentó un promedio de 84 % de polen de *Eucalyptus sp.* Si bien se trata de un polen con tendencia a la sobre-representación en los recuentos melisopalinológicos, estos porcentajes superan el umbral habitualmente utilizado para clasificar mieles como monoflorales ( $\geq 70$  %). La elevada representación de polen de *Eucalyptus sp.* sugiere que estos árboles, probablemente ubicados en las cercanías del área protegida, actuaron como recurso floral primario durante el muestreo 2023. Este predominio puede atribuirse, en parte, a las condiciones de sequía registradas en la región, que llevaron al Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca a declarar la emergencia agropecuaria en octubre de 2022, afectando a varios sectores productivos, incluida la apicultura (Cortelezzi *et al.*, 2023). En condiciones de estrés hídrico, la floración de muchas especies nativas suele reducirse o retrasarse, mientras que los eucaliptos, conocidos por su elevada tolerancia a estas condiciones adversas (Corbella *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 2006), continúan floreciendo y aportando recursos nutricionales. Esto probablemente condujo a una mayor dependencia de las abejas a la floración de *Eucalyptus sp.* como fuente de alimento.

## **5.2. Parámetros fisicoquímicos, bioactivos y digestibilidad *in vitro***

Todos los resultados se encontraron dentro de los límites establecidos: acidez libre ( $\leq 50$  meq./Kg), contenido de humedad (máx. 20g/100g) y HMF (máx. 60mg/Kg) de acuerdo con la normativa alimentaria nacional y del MERCOSUR (Reglamento Bromatológico Nacional, 2022; MERCOSUR, 1999), con la excepción de la muestra 22-A1, que presentó valores de HMF superiores a 60 mg/kg. Este resultado podría explicarse por una exposición a temperaturas elevadas durante el almacenamiento de esta muestra, dado que el HMF tiende a incrementarse como consecuencia del calentamiento y del envejecimiento de la miel (Da Silva *et al.*, 2016).

Con respecto a la conductividad eléctrica, parámetro no regulado por el RBN, 8 muestras estuvieron por debajo del máximo establecido para mieles florales por el Codex Alimentarius ( $\leq 800$   $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) umbral que se utiliza como criterio para diferenciar

mieles de néctar de mieles de mielada o mezclas, las cuales suelen tener conductividades  $> 800 \mu\text{S}/\text{cm}$  (Codex Standard, 2001). Aunque las demás muestras excedieron dicho umbral, el elevado contenido de polen observado en los análisis melisopalínológico de las muestras, indica un origen predominantemente floral, por lo que no correspondería a la categoría de mieles de mielada.

Además, los valores de conductividad obtenidos, son consistentes con otras mieles de origen botánico diverso: como mieles de frutilla (454 a  $1120 \mu\text{S}/\text{cm}$ , Tananaki *et al.*, 2025); mieles de castaño ( $1160 \mu\text{S}/\text{cm}$ , Sánchez-Martín *et al.*, 2022)( $1430 \mu\text{S}/\text{cm}$ , Ucurum *et al.*, 2024); mieles de Nueva Caledonia, Francia (404 –  $1464 \mu\text{S}/\text{cm}$ , Bucekova *et al.*, 2023) y en mieles de la región central de Panamá (236 and  $939 \mu\text{S}/\text{cm}$ , Rivera-Mondragón *et al.*, 2023). Asimismo, en un marco regional, mieles recolectadas en distintos departamentos de Entre Ríos, Argentina mostraron un amplio rango de conductividad  $240\text{--}1810 \mu\text{S}/\text{cm}$  (Brelis *et al.*, 2023). En Uruguay, se han descrito mieles florales procedentes de bosques naturales y de flora nativa, con significativo contenido de polen y con conductividades que también superaron el límite establecido: entre 400 a  $1700 \mu\text{S}/\text{cm}$  por Godoy *et al.*, (2024); 353 a  $1027 \mu\text{S}/\text{cm}$  por Tamaño & Cora, (2022); entre 410 a  $930 \mu\text{S}/\text{cm}$  por Cracco *et al.*, (2022).

Estos antecedentes sugieren la necesidad de profundizar en el estudio de las características de los suelos uruguayos y su contenido mineral, factores que podrían contribuir en la alta conductividad observada. Asimismo, los resultados obtenidos indican que los valores fijados por la normativa podrían revisarse considerando las particularidades que presentan las mieles de esta región, a fin de evitar clasificaciones erróneas como mielada por su alta conductividad en mercados de exportación, y la consecuente pérdida económica para el sector apícola. En este sentido sería de interés incluir estudios de composición polínica que contribuyan a la valorización de las mieles locales como se propone en esta tesis.

Por su parte, el análisis de componentes principales permitió identificar asociaciones relevantes sobre los parámetros fisicoquímicos, destacándose una relación directa entre el HMF y el color, en contraste con el pH y la conductividad, que se ubicaron en el extremo opuesto de la primera dimensión. La acidez y la humedad fueron las variables que contribuyeron a la segunda dimensión. No obstante, el PCA no logró separar los grupos polínicos previamente definidos, lo que podría indicar que los parámetros

fisicoquímicos están más influenciados por factores ambientales, edáficos y condiciones de maduración que por el origen floral de las mieles (Feknous & Boumendjel, 2022; Montenegro *et al.*, 2013). Sin embargo, se observaron tendencias interanuales bien definidas: las mieles de 2022 se asociaron con valores más altos de HMF y color; las de 2023 presentaron pH y conductividad superiores; mientras que las de 2024 exhibieron un perfil intermedio. No obstante, dado que la cosecha 2022 estuvo integrada mayoritariamente por mieles poliflorales y las del 2024 por mieles del grupo 2, resulta difícil discriminar en este caso cuánto de la respuesta se atribuye al efecto “año” y cuánto al efecto “origen floral”.

En el estudio de los componentes bioactivos, el contenido de fenoles totales (TPC) mostró una marcada variabilidad entre las muestras, determinada nuevamente por el año de cosecha (Tabla 4.5). Las mieles recolectadas en 2022 presentaron los valores más elevados, mientras que las correspondientes a 2023 y 2024 mostraron concentraciones más próximas a las registradas para la miel de Manuka. En particular, los valores obtenidos en este estudio ( $763 \pm 5,9$  mg GAE/kg) fueron comparables a los reportados por George *et al.* (2025) para Manuka ( $726 \pm 7,76$  mg GAE/kg). Además, estos resultados se encuentran dentro de los rangos reportados para mieles españolas (340–2420 mg GAE/kg; Alevia, *et al.*, 2021), mieles de Argelia (197 – 4641 mg GAE/Kg; Harbane *et al.*, 2024) para mieles de flora nativa de Chile (848–1814 mg GAE/kg; Montenegro *et al.*, 2013), y superan los valores descritos para mieles de Polonia (378–776 mg GAE/kg; Kunat-Budzyńska *et al.*, 2023) y de Eslovaquia (91–452 mg GAE/kg; Bucekova *et al.*, 2019).

Como se explicó en la Metodología, la determinación de TPC no presenta especificidad exclusiva por compuestos fenólicos, pudiendo reaccionar otras sustancias con capacidad reductora, como los azúcares reductores y algunos aminoácidos presentes en la miel (Lawag *et al.* (2023) y Ky *et al.* (2014). En este sentido, algunos autores definen en lugar de TPC, TRC (*total reducing capacity*), capacidad reductora total (Farkas, 2022).

Por otro lado, las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se encuentran dentro de los rangos reportado por Osés *et al.*, 2024; Bucekova *et al.*, 2023; AL-Waili *et al.*, 2013; Brudzynski *et al.*, 2011. Dada la relevancia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la actividad antibacteriana de la miel, diversos investigadores han cuantificado su concentración, pero empleando diferentes

metodologías, lo que en muchos casos dificulta la comparación directa entre estudios. En los trabajos previamente mencionados, la cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realizó en un rango de diluciones de miel comprendido entre 50 % y 20 %, utilizando métodos de medición basados en fluorescencia. De este modo, se observó que, mientras en el ensayo analítico la señal de fluorescencia disminuye al diluir el estándar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en las muestras de miel la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado aumenta al reducirse la concentración de miel. En esta tesis se observó el mismo efecto, para todos los grupos polínicos de mieles de Montes del Queguay a menor concentración de miel se obtuvo mayor concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 4.7).

Por otro lado, se estudió la variación de concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para determinar si las mieles mostraban un comportamiento coherente con el perfil no lineal tipo “U invertida” descrito por (Brudzynski, 2020). En este estudio no fue posible corroborar que la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumente con el tiempo tras la dilución, como han señalado otros autores (Bucekova *et al.*, 2023; Lehmann *et al.*, 2019), salvo la muestra: 23-F2 donde se observa en la Figura 3.8 un aumento a las 4 hs de medición y luego un descenso. En este sentido, los perfiles temporales mostraron una disminución progresiva de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la mayoría de las muestras, aunque con respuestas claramente diferenciadas entre ellas. Algunas mieles conservaron más del 70 % de la concentración inicial tras 6 horas, mientras que otras descendieron a niveles cercanos o incluso por debajo del límite de detección en ese mismo período.

La rápida pérdida observada en ciertas muestras podría deberse no sólo a una mayor actividad catalasa o al mayor contenido fenólico (mayor capacidad antioxidante), sino también a la interacción de estas variables con el tiempo de almacenamiento. Las mieles de 2024 resultaron más estables que las de 2022, probablemente porque fueron analizadas a los seis meses de su recolección, mientras que las de 2022 se evaluaron después de dos años. Este factor temporal podría haber favorecido la degradación enzimática o la pérdida de compuestos relacionados con la generación del peróxido. Gruznov *et al.* (2024) observaron que el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en mieles monoflorales almacenadas 12 meses depende fuertemente de la temperatura: se mantuvo relativamente estable a 0–5 °C, mientras que a 18 °C el descenso significativo comenzó a partir del sexto mes, con variaciones según el origen botánico. Este antecedente sugiere que el tiempo de almacenamiento puede influir en la estabilidad; por lo que

sería conveniente analizar las mieles en una ventana postcosecha comparable (3–6 meses) o conservarlas en condiciones controladas.

Al comparar la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre grupos polínicos, las mieles poliflorales (G1) y las de *B. salicifolius* (G2) se caracterizaron por concentraciones moderadas y, especialmente, por una variabilidad marcada entre muestras. En contraste, las medianas más altas se concentraron en grupos específicos: *Eucalyptus* sp. en la dilución al 25% (p/v) y *S. buxifolia* en la dilución al 40% (p/v), lo que sugiere que ciertos orígenes pueden favorecer mayores niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bajo determinadas diluciones. No obstante, la dispersión observada dentro de los grupos y en particular en G1 y G2, indica que la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no depende exclusivamente del origen botánico; además, como se evidenció en los perfiles temporales, mieles de un mismo origen, pero de diferentes años de cosecha pueden presentar concentraciones distintas (Figura 4.8).

La dinámica del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las mieles refleja un equilibrio entre su generación y su consumo/transformación dentro de una matriz compleja: además de la producción asociada a la glucosa oxidasa, el peróxido puede degradarse mediante reacciones catalizadas por Fe/Cu, con formación de radicales, y participar en reacciones con polifenoles y ácido benzoico que originan otras especies oxidantes más estables, lo que contribuiría a explicar su rápida disminución en algunas muestras (Khataybeh *et al.*, 2023; Guttentag *et al.*, 2021) y ayuda a comprender por qué el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no siempre se relaciona de forma directa con variables enzimáticas (GOx) o con la bioactividad (Sanhueza & Fuentes, 2025; Brudzynski, 2023).

Por otro lado, al evaluar el posible efecto del proceso digestivo sobre los componentes bioactivos, las 14 mieles de la cosecha 2024 mostraron un incremento significativo del TPC tras la digestión *in vitro* (Figura 4.17) Este aumento podría estar relacionado con una mayor bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos, dado que numerosos polifenoles dietarios se encuentran en forma conjugada con azúcares (glucósidos) o fuertemente asociados a otros componentes de la matriz alimentaria, lo que limita su extracción, pero permite su liberación progresiva durante la digestión, por acción de enzimas con actividad β-glucosidasa, del ácido gástrico y de las enzimas intestinales (Núñez-Gómez *et al.*, 2023; Rudrapal *et al.*, 2022). Resultados similares fueron reportados por Alevia *et al.* (2021) en mieles españolas de distintos orígenes botánicos, donde también se observó un aumento del TPC tras la digestión (antes de la digestión:

24 - 242 mg/100 g; después de la digestión: 108–211 mg/100 g). En contraste, O'Sullivan *et al.*, 2013, trabajaron con mieles comerciales de Irlanda y no encontraron diferencias significativas en el contenido de polifenoles tras la digestión. Asimismo, investigaciones como las de Magoshi *et al.*, 2023 en mieles Fynbos de Sudáfrica y Seraglio *et al.*, 2017 en mieles de Brasil, informaron una disminución en la concentración de polifenoles después de la simulación digestiva. Esta variabilidad en los resultados podría atribuirse a las características particulares de los compuestos fenólicos presentes en cada tipo de miel, que pueden mostrar distinta sensibilidad frente a las condiciones del proceso digestivo (Alevia *et al.*, 2021). Sin embargo, pese al aumento del TPC tras la digestión *in vitro*, las fracciones digeridas no mostraron actividad antimicrobiana en las condiciones evaluadas, lo que confirma el efecto de la dilución en la bioactividad y/o de compuestos que se modifican o no quedan disponibles durante la digestión.

### **5.3. Actividad antimicrobiana**

#### **5.3.1 Influencia del año de cosecha y variabilidad fisicoquímica**

La actividad antimicrobiana de las mieles estuvo fuertemente modulada por el año de cosecha, en concordancia con las diferencias fisicoquímicas y melisopalinológicas observadas. Este patrón coincide con estudios que destacan que la bioactividad de las mieles depende de múltiples factores ambientales y productivos, incluyendo condiciones climáticas, composición floral, nutrientes del suelo, manejo de colmenas y procesos posteriores a la cosecha (Xie & Coghi, 2025; Bazaid *et al.*, 2022; Nolan *et al.*, 2019).

En términos generales, las mieles cosechadas en 2022 mostraron mayor potencia inhibitoria, las de 2023 un desempeño menor, y 2024 exhibió actividad tanto inhibitoria como microbicida. Esto se reflejó también en el contenido fenólico total, el color y la posición en el PCA, donde 2022 con mayor TPC, se asoció a mayor intensidad de color, indicadores vinculados a compuestos pro-oxidantes y actividad antibacteriana (Brudzynski, 2023). Las mieles de 2023 se asociaron a pH más elevado, mayor contenido de humedad y conductividad eléctrica, mientras que 2024 representó un perfil intermedio con asociación positiva a conductividad eléctrica y pH (Figura 4.6).

La variación interanual observada es consistente con lo reportado globalmente para mieles expuestas a fluctuaciones ambientales, estrés vegetal o cambios en la disponibilidad floral, donde ciclos de floración afectan tanto el contenido de polifenoles como la expresión de componentes peróxido y no peróxidos dependientes (Brudzynski *et al.*, 2011).

Respecto al estudio de la posible actividad antimicrobiana por volátiles no se observó efecto frente a los microorganismos en las condiciones evaluadas. Sin embargo, la literatura sugiere que los compuestos volátiles (y también los no volátiles/semi-volátiles) pueden contribuir parcialmente a la actividad antibacteriana de la miel (Ogwu *et al.*, 2025; Feknous & Boumendjel, 2022). En miel monofloral de Ulmo, por ejemplo, se identificó un perfil amplio de volátiles (50 compuestos, aislados por microextracción en fase sólida) y de compuestos no volátiles/semi-volátiles, y se propuso que esta diversidad-particularmente rica en derivados bencénicos-podría explicar en parte su bioactividad, incluyendo actividad antibacteriana (Acevedo *et al.*, 2017). En este marco, la ausencia de efecto en nuestro ensayo podría deberse a concentraciones insuficientes en la fase gaseosa y/o a que su contribución requiera condiciones de exposición diferentes o interacción con otros constituyentes de la matriz.

### 5.3.2 Papel de la composición botánica

Los modelos basados en árboles de partición (Tabla 4.8) indicaron que el año de cosecha fue la variable con mayor influencia en el potencial antimicrobiano, y la composición polínica surgió como el segundo predictor. Dado que la distribución botánica cambió entre años -predominio polifloral en 2022 y Grupo 2 (dominado por *B. salicifolius*) en 2024- el efecto “cosecha” no puede considerarse independiente del origen floral. Trabajos previos han demostrado también vínculos entre familias botánicas y bioactividad. Bucekova *et al.* (2023) mostraron que mieles ricas en Myrtaceae presentan mayor capacidad inhibidora. *B. salicifolius*, integrante de esta familia, podría aportar compuestos comunes con relevancia antimicrobiana, hipótesis coherente con la mayor frecuencia de MIC y MMC bajas en mieles 2024.

Asociaciones adicionales detectadas sugieren que mayor proporción de pólenes de *Lotus* o bajas representaciones de *Gleditsia* se vinculan con mayor efecto frente a *S.*

*aureus*, mientras que concentraciones elevadas de Papilionoideae o Brassicaceae se asociaron con menor actividad frente a *E. coli*, posiblemente por dilución o antagonismo químico entre floraciones. Adicionalmente, *T. australis* emergió como marcador de inhibición frente a *P. aeruginosa*, reforzando su potencial en flora nativa.

### 5.3.3. Actividad antibacteriana

La sensibilidad variable entre Gram-positivas y Gram-negativas ha sido ampliamente documentada. Aunque algunos estudios reportan mayor susceptibilidad de las Gram-positivas (Bucekova *et al.*, 2023; Grecka *et al.*, 2018), existen casos opuestos (Gkoutzouvelidou *et al.*, 2021; Escuredo *et al.*, 2012), reflejando que la bioactividad de la miel depende más del origen y composición de la miel que del tipo de pared celular de las bacterias. Entre los mecanismos involucrados se describen daño de membrana, permeabilización de lipopolisacáridos y alteraciones de la división celular, con contribución tanto peróxido dependiente como no dependiente (Bezerra *et al.*, 2024). Los resultados obtenidos en este trabajo son consistentes con la naturaleza multifactorial de la actividad antibacteriana de la miel. A concentraciones altas, la elevada osmolaridad y la baja actividad de agua generan un intenso estrés osmótico que limita el crecimiento microbiano, mientras que el pH ácido contribuye a crear un ambiente desfavorable para diversos procesos metabólicos. Sin embargo, estos factores fisicoquímicos por sí solos no explican completamente la actividad observada, ya que en esta tesis la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentó al disminuir la concentración de miel, evidenciando que el componente peróxido puede expresarse con mayor intensidad en condiciones de dilución intermedia.

En cuanto a diferencias de susceptibilidad, en este estudio *P. aeruginosa* fue la bacteria más sensible, el 68,2% de las muestras de miel presentó MIC  $\leq$  26,7% (p/v) y el 90,9% de las mismas tuvieron efecto microbicida, incluyendo valores tan bajos como 13,3% (p/v). Los rangos se alinean con mieles de diversas regiones del mundo, incluyendo Letonia, Canadá y Malasia (Henriques *et al.*, 2011; Girma *et al.*, 2019; Skadiņš *et al.*, 2023; Tan *et al.*, 2009). Esta actividad se reforzó en 2024, coherente con la predominancia de *B. salicifolius* y la asociación del Grupo 2 con mayor bioactividad.

*S. aureus* mostró alta sensibilidad en mieles del 2022 y 2024, mientras que en las del 2023 la actividad fue consistentemente inferior. Aunque varios pólenes se asociaron a mayor efecto, ninguno fue determinante único. *E. coli* fue también tolerante a estas

mieles, requiriendo  $\geq 26,7\%$  (p/v) para inhibición o muerte celular, en concordancia con estudios de mieles españolas y bálticas (Alevia *et al.*, 2021; Skadiņš *et al.*, 2023). Para esta bacteria, *B. salicifolius* se presentó como el mejor predictor de efecto microbicida.

#### 5.3.4. Actividad antifúngica

El perfil antifúngico evidenció diferencias claras entre especies. *A. brasiliensis* fue resistente en todo el rango ensayado, lo cual concuerda con estudios que describen alta tolerancia fúngica y necesidad de concentraciones superiores a las requeridas para bacterias (Bazaid *et al.*, 2022; Brudzynski, 2006). El hecho de que *C. albicans* resultara más susceptible que *A. brasiliensis* pero más resistente que las bacterias concuerda con lo señalado por Fernandes *et al.* (2020), quienes señalaron que la presión osmótica - mecanismo importante en la inhibición bacteriana- es menos efectiva en levaduras. Asimismo, los valores observados se alinean con estudios que reportan MIC altas y ausencia de muerte celular por debajo de concentraciones muy elevadas en mieles monoflorales europeas (Fernandes *et al.*, 2020). Aunque ensayos cualitativos de difusión han detectado inhibición fúngica en otras regiones (Kunat-Budzyńska *et al.*, 2023), metodologías basadas en microdilución –como la empleada aquí- tienden a revelar mayor resistencia.

La asociación entre actividad fungicida y polen de *B. salicifolius* sugiere que este taxón podría contribuir de forma sinérgica con el sistema glucosa oxidasa-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mecanismo clave en el control de levaduras (Irish *et al.*, 2011; Fernandes *et al.*, 2021). Resulta también consistente la ausencia de efecto en concentraciones bajas, en línea con la resistencia fisiológica de levaduras a la presión osmótica (Fernandes *et al.*, 2020). Comparativamente, mieles de Aroeira presentan actividad significativamente mayor frente a *C. albicans* (Lima *et al.*, 2022), reforzando una vez más la importancia del origen floral.

### 5.3.3 Comparación con mieles internacionales y miel de Manuka

Los valores de MIC y MMC obtenidos para las mieles estudiadas se ubicaron dentro del rango descrito para mieles de Europa, Oceanía y América (Alevia *et al.*, 2021; Skadiņš *et al.*, 2023; Tan *et al.*, 2009; Brudzynski *et al.*, 2011). La miel de Manuka mostró actividad superior, especialmente frente a bacterias Gram-negativas, con MIC y MMC

tan bajos como 6–13% (p/v), coherentes con estudios sobre UMF 5+ a 25+ (Henriques *et al.*, 2011; Girma *et al.*, 2019). Si bien varias mieles locales igualaron su MIC frente a *P. aeruginosa*, Manuka alcanzó actividad bactericida a concentraciones similares, confirmando un aporte adicional de mecanismos no peróxido dependientes.

En conjunto, los resultados demuestran que las mieles de esta región presentan actividad antimicrobiana comparable a la registrada en mieles bioactivas de referencia, incluyendo Manuka. La bioactividad estuvo modulada por una interacción entre año de cosecha, composición botánica y factores fisicoquímicos que influyen en la expresión y estabilidad de metabolitos antibacterianos y antifúngicos. La integración de análisis ambientales, melisopalinológicos y metabolómicos permitirá identificar floraciones clave - como *B. salicifolius* y *T. australis* - y comprender cómo la variabilidad interanual determina el potencial terapéutico de las mieles.

#### 5.3.4 Inhibición de formación de biofilms

La capacidad antibiofilm de las mieles evaluadas mostró un perfil dependiente de la concentración y marcadamente distinto entre los microorganismos evaluados. Este comportamiento se alinea con lo observado previamente en los ensayos de MIC y MMC, donde *P. aeruginosa* fue el microorganismo que mostró, en términos globales, mayor sensibilidad a las mieles en comparación con *S. aureus*. Nueve muestras alcanzaron niveles de inhibición de biofilm  $\geq 90\%$  frente a *P. aeruginosa* en concentraciones intermedias de miel (26,7 %(p/v)), mientras que *S. aureus* requirió, en general, concentraciones más elevadas. En términos de aplicabilidad, la inhibición de biofilm frente a *P. aeruginosa* es especialmente relevante en el contexto de heridas crónicas, donde los biofilms explican gran parte de las infecciones persistentes y la respuesta limitada a antibióticos (Lu *et al.*, 2019).

En comparación con la miel de referencia Manuka, varias de las mieles fueron igual de eficientes en la inhibición de formación de los biofilms bacterianos evaluados. Si bien no se han encontrado en la literatura muchos reportes de inhibición de biofilms por miel de Manuka en las condiciones evaluadas en esta tesis, en concordancia, Pleeging *et al.*, (2020) observaron en un modelo de biofilm de herida *in vitro* sobre dermis artificial, que un producto comercial que contenía 100% miel de Manuka - Medihoney®- inhibió la formación de biofilm de *P. aeruginosa* PAO1 (reduciendo 1,45 log las células bacterianas con respecto al control del biofilm formado sin tratamiento).

Este patrón de mayor sensibilidad de *P. aeruginosa* durante la formación del biofilm, es consistente con lo reportado por Skadiņš *et al.* (2023), donde evaluaron mieles de diferentes orígenes botánicos, a una concentración de 80 % p/v, frente a patógenos asociados a infecciones de heridas crónicas. Observaron una mayor actividad antibiofilm frente a bacterias Gram-negativas que sobre las Gram-positivas, reportando a la concentración evaluada, porcentajes de inhibición de formación de biofilm de *P. aeruginosa* ATCC 27853 entre 40 % a 72 % y de *S. aureus* ATCC 25923 25 % a 62 %.

Balázs *et al.*, (2023) describe que *P. aeruginosa* presenta una matriz de biofilm compleja, en la que el alginato contribuye a la tolerancia a antimicrobianos; sin embargo, su transición a biofilm y su virulencia dependen fuertemente de procesos regulados por quorum sensing (QS), que gobiernan adhesión y maduración del biofilm. En línea con este mecanismo, Bazaid *et al.* (2022) reportaron que ciertas mieles saudí presentaban actividad anti-QS y reducían factores regulados por QS en *P. aeruginosa*. En este marco, la tendencia observada en nuestras muestras sugiere que el Grupo 2 (*B. salicifolius*), que mostró mayor eficiencia frente a *P. aeruginosa*, podría estar asociado a un perfil químico con capacidad de interferir no solo en parámetros fisicoquímicos (osmolaridad, pH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, compuestos fenólicos), sino también en procesos regulados por QS durante etapas tempranas del biofilm. Si bien este estudio no evaluó QS de forma directa, antecedentes recientes muestran que el origen botánico puede condicionar marcadamente la actividad antibiofilm en *P. aeruginosa*; por ejemplo, mieles monoflorales iraníes presentaron respuestas dependientes de la concentración y diferencias entre orígenes (Alshaybawee *et al.*, 2025).

En conjunto, si bien existe evidencia de que el origen botánico se asocia con mayor o menor actividad antibacteriana/antibiofilm, estas actividades están estrechamente vinculadas a la composición química de la miel. Dicha composición resulta de la interacción entre factores endógenos (principalmente el origen botánico) y factores exógenos, como el área geográfica de las colmenas, las condiciones climáticas y los procesos de cosecha, entre otros. En consecuencia, cada miel constituye una matriz natural única cuya caracterización fisicoquímica permite comprender mejor su potencial biológico (Nan *et al.*, 2025).

### 5.3.5 Correlaciones entre actividad antimicrobiana y parámetros fisicoquímicos y químicos

El mapa de correlaciones confirma que los indicadores microbiológicos tienden a moverse en conjunto: cuando una miel presenta mejor desempeño inhibitorio se asocia a mayor probabilidad de efecto microbicida (MC) y en el caso de *S. aureus* a mayor actividad antibiofilm. En cambio, frente a *P. aeruginosa* no se observa la misma correspondencia entre la actividad planctónica y la inhibición del biofilm, y este desacople ha sido reportado en estudios previos. Por ejemplo, mieles de Portugal con MIC similares mostraron eficacias diferentes sobre biofilms bacterianos (Bezerra *et al.*, 2024). Asimismo, Farkas *et al.* (2022) no observaron una correlación significativa entre MIC y efecto antibiofilm en mieles de Hungría.

Por otro lado, la asociación inversa entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los indicadores de actividad antimicrobiana puede interpretarse considerando el efecto de la dilución. En estas mieles, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cuantificado fue mayor en concentraciones más bajas y menor a mayor porcentaje de miel. Esto es consistente con que la dilución activa GOx y modula la acumulación de peróxido (Brudzynski & Sjaarda, 2021; Masoura *et al.*, 2020). Al mismo tiempo, la probabilidad de observar actividad antimicrobiana aumenta al incrementar la concentración de miel por efectos de matriz (osmolaridad/pH) y por la contribución de componentes no peróxido (Proaño *et al.*, 2021).

En cuanto al TPC, se observaron asociaciones significativas, pero no uniformes entre variables (asociación positiva con *IC\_P* y negativa con *InBiof\_P*). Este comportamiento es similar a lo descrito en mieles de castaño, donde la mayor actividad antimicrobiana podría explicarse por componentes no peróxido (como flavonoides), pero no se estableció relación directa entre las concentraciones de compuestos fenólicos analizados y la respuesta biológica. En ese mismo trabajo, se demuestra que la capacidad antioxidante se correlacionó con los valores de MIC (Farkas *et al.*, 2022). En contraste, también se ha reportado que mieles con mayor contenido de fenoles y flavonoides presentan un mejor desempeño antimicrobiano, lo que confirma que la contribución de los compuestos fenólicos puede ser relevante pero no universal (Nan *et al.*, 2025).

Asimismo, la colinealidad marcada entre fenoles y pH, junto con la asociación positiva  $H_2O_2$ -pH, sugiere que parte de las correlaciones con actividad podrían reflejar perfiles composicionales: mieles más ácidas y ricas en fenoles versus mieles con pH más alto y mayor componente peróxido. En este marco, la asociación negativa entre fenoles e inhibición de biofilm en *P. aeruginosa* podría interpretarse como resultado de esta estructura conjunta de variables. Además, debe considerarse que los fenoles pueden actuar simultáneamente como fitocomponentes antimicrobianos y como antioxidantes. En este último rol, pueden modular la dinámica redox, incluyendo la persistencia del  $H_2O_2$ . Esto concuerda con la evidencia de que la relación entre concentración de  $H_2O_2$  y potencia antibacteriana no siempre es lineal. Se han descrito casos con correlación débil o nula entre  $H_2O_2$  y actividad antibacteriana, lo que apoya la naturaleza multifactorial de la matriz miel (Tsavea *et al.*, 2022; Farkas *et al.*, 2022). Además, se ha reportado que el  $H_2O_2$  explica solo una fracción de la variación de la actividad entre mieles. Algunas muestras pueden perder  $H_2O_2$  rápidamente por acción de catalasas o por consumo en reacciones redox mediadas por antioxidantes, sin que ello elimine necesariamente la actividad global (Guttentag *et al.*, 2021).

#### **5.4. Discusión general**

En una discusión de alcance general, los resultados de esta tesis se insertan en un escenario internacional donde la investigación sobre mieles con actividad antimicrobiana enfrenta limitaciones metodológicas relevantes, particularmente la falta de estandarización en el tipo de miel y en las concentraciones empleadas en los ensayos, lo que dificulta la comparación entre estudios y la construcción de evidencias sólidas que permitan avanzar hacia guías de uso clínico (Xie & Coghi, 2025). Esta ausencia de criterios homogéneos contribuye, además, a la existencia de resultados inconsistentes en la literatura, frecuentemente asociados a diferencias en la calidad de las mieles, su procesamiento, posible contaminación y variabilidad composicional, factores que impactan directamente en la eficacia biológica observada (Ogwu & Izah, 2025). En este contexto, la caracterización integral de mieles de Montes del Queguay aporta información relevante y necesaria para reducir esa brecha de conocimiento, al vincular origen botánico, parámetros fisicoquímicos y actividad antimicrobiana en un entorno de alta biodiversidad y baja intervención antrópica.

En paralelo, la evidencia disponible sugiere que una de las aplicaciones clínicas más relevantes de la miel es el manejo tópico de heridas, particularmente en lesiones crónicas donde la persistencia de la infección se asocia a la formación de biofilms y a una menor respuesta a antibióticos. En este marco, estudios clínicos han confirmado que los apósitos con miel pueden acelerar la cicatrización y mejorar los desenlaces en pacientes con úlceras diabéticas y quemaduras (Ogwu *et al.*, 2025; Combarros-Fuertes *et al.*, 2020). Considerando estos antecedentes y los resultados obtenidos en esta tesis (incluida la marcada inhibición de biofilm de *P. aeruginosa*), las mieles de Montes del Queguay emergen como candidatas de interés para explorar usos no alimentarios en formulaciones a base de miel (geles, apósitos u ungüentos), siempre condicionado a la realización de estudios adicionales que evalúen su desempeño en condiciones clínicas y bajo estándares de calidad apropiados.

A su vez, el creciente interés de consumidores cada vez más conscientes de la salud por productos naturales, funcionales y de alta calidad refuerza la importancia de generar evidencia científica que respalde la diferenciación y valorización de mieles singulares (Brčina *et al.*, 2021; Machado *et al.*, 2020).

Desde una perspectiva más amplia, la producción de miel con atributos funcionales no solo puede contribuir al desarrollo de economías locales, especialmente en áreas rurales, sino también promover prácticas apícolas y agrícolas sostenibles, fortalecer la conciencia comunitaria sobre la biodiversidad y resaltar el rol crítico de los polinizadores en la seguridad alimentaria (Pippinato *et al.*, 2020). En este sentido, resulta clave considerar el impacto ambiental de los sistemas productivos, dado que el uso intensivo de pesticidas y los monocultivos amenazan la salud de las abejas, la biodiversidad y la viabilidad a largo plazo de la apicultura, reforzando la necesidad de apoyar modelos de producción sustentables y a los apicultores locales como parte de una estrategia integral que articule salud, ambiente y desarrollo (Ogwu & Izah, 2025).

## 6. Conclusiones y Perspectivas

Esta tesis presentó un estudio integral del potencial antimicrobiano de mieles producidas en el entorno de Montes del Queguay, abordando de manera conjunta el origen botánico, la caracterización fisicoquímica y los ensayos microbiológicos frente a bacterias y hongos de interés. Mediante herramientas multivariadas, se exploró la relación entre la variabilidad composicional de las mieles y su desempeño biológico.

En primer lugar, el análisis melisopalinológico confirmó que las mieles de Montes del Queguay presentan una alta diversidad de tipos polínicos pertenecientes a familias de flora nativa. Se identificaron como taxones predominantes *S. buxifolia*, *B. salicifolius*, otras Myrtaceae nativas y *T. australis*, lo que evidencia la relevancia del ecosistema como fuente de néctar y aporta evidencia para estrategias de diferenciación basadas en origen botánico

En relación con los parámetros fisicoquímicos, las mieles cumplieron con los límites normativos nacionales y del MERCOSUR para humedad, acidez libre y HMF, excepto una muestra con HMF elevado. En cuanto a la conductividad eléctrica, las muestras mostraron valores relativamente altos en la mayoría de los casos en línea con lo reportado para ciertas mieles de otras latitudes, aun cuando la evidencia melisopalinológica indicó un origen predominantemente floral. Dado que este parámetro se asocia estrechamente con el contenido de minerales, los resultados apoyan la necesidad de profundizar el rol de factores edáficos/minerales locales y sugieren que, para evitar clasificaciones erróneas en mercados de exportación, sería conveniente considerar enfoques integrados que incluyan composición polínica y caracterización fisicoquímica en la valorización de mieles uruguayas.

El contenido de TPC mostró alta variabilidad y estuvo fuertemente asociado al año de cosecha, con valores más altos en 2022. La concentración de  $H_2O_2$  se ubicó dentro de rangos reportados internacionalmente y reprodujo el patrón típico de mayor generación a menores concentraciones de miel. Los perfiles temporales evidenciaron comportamientos heterogéneos, con muestras que mantuvieron niveles elevados por varias horas y otras con descensos rápidos. La estabilidad del componente peróxido se interpretó como resultado del balance entre generación y consumo/degradación en una matriz compleja, y los antecedentes bibliográficos refuerzan que el tiempo de

almacenamiento puede afectar la fracción peróxido-dependiente; por ello, para futuras comparaciones entre cosechas es recomendable analizar en ventanas postcosecha comparables (3–6 meses) o conservar bajo condiciones controladas de temperatura.

Tras la simulación digestiva *in vitro*, las mieles 2024 mostraron un incremento significativo del TPC, compatible con mayor bioaccesibilidad de compuestos reductores/fenólicos. Sin embargo, las fracciones digeridas no presentaron actividad antimicrobiana en las condiciones evaluadas, lo que sugiere que la dilución y/o las transformaciones durante la digestión reducen la bioactividad detectable en el ensayo microbiológico.

La actividad antimicrobiana estuvo principalmente determinada por el año de cosecha. Los árboles de partición identificaron al año como principal predictor y a la composición polínica como segundo, sugiriendo una interacción entre variabilidad interanual y origen floral, en este sentido, se destacaron asociaciones vinculadas con *B. salicifolius*. En cuanto a la sensibilidad microbiana, *P. aeruginosa* fue el microorganismo más sensible, *E. coli* el más tolerante y *S. aureus* mostró mejor respuesta en 2022 y 2024 que en 2023. Con respecto a la actividad antifúngica, *A. brasiliensis* fue resistente y *C. albicans* presentó sensibilidad intermedia. En general, las mieles se ubicaron en rangos internacionales y algunas se aproximaron a Manuka.

Por otro lado, la inhibición de biofilm dependió de la concentración y del microorganismo: varias muestras lograron  $\geq 90\%$  de inhibición frente a *P. aeruginosa* a concentraciones intermedias, mientras que *S. aureus* requirió concentraciones mayores. Dado su relevancia en heridas crónicas, estos resultados apoyan explorar usos no alimentarios bajo estudios adicionales de eficacia, seguridad y estandarización.

En conjunto, los resultados respaldan la hipótesis de que las mieles de Montes del Queguay, provenientes de un entorno con predominio de flora nativa y baja intervención antrópica, presentan características botánicas, fisicoquímicas y biológicas de interés. Aunque la actividad antimicrobiana y antibiofilm estuvo modulada por una interacción compleja entre la composición y el año de cosecha, los resultados obtenidos respaldan su potencial de valorización. A esto se suma el valor ecológico del sistema apícola en la región, dado que la actividad de las abejas podría contribuir a la polinización de la flora nativa, favoreciendo el mantenimiento de procesos ecológicos y la conservación de la biodiversidad en Montes del Queguay.

A partir de los resultados obtenidos, se abren diversas perspectivas de investigación y aplicación. En primer lugar, resulta relevante seguir avanzando hacia esquemas de tipificación y estandarización que integren información melisopalinológica, fisicoquímica y mineral, en línea con los abordajes que viene desarrollando el equipo de trabajo en el cual se desarrolla esta tesis (Tamaño & Cora, 2022; Zapata *et al.*, 2025). En este marco, el presente estudio aporta evidencia funcional de la actividad antimicrobiana, que complementa la caracterización fisicoquímica y mineral lo que permitiría mejorar la clasificación y valorización de estas mieles y reducir el riesgo de interpretaciones inadecuadas en el marco de normativas internacionales.

La marcada influencia del año de cosecha sobre el contenido fenólico y la actividad antimicrobiana destaca la necesidad de estudios interanuales que incorporen variables ambientales y climáticas para comprender los determinantes de la bioactividad. Asimismo, las asociaciones observadas entre ciertos taxones polínicos y el desempeño antimicrobiano justifican la aplicación de enfoques analíticos dirigidos a identificar compuestos bioactivos y marcadores químicos específicos.

Por otro lado, futuros trabajos deberían profundizar en la contribución relativa de las fracciones peróxido y no peróxido, así como en el impacto de las condiciones de almacenamiento postcosecha sobre la estabilidad de la actividad biológica. Los resultados de digestión *in vitro* sugieren explorar modelos más complejos que permitan evaluar efectos indirectos o moduladores de los compuestos liberados tras la digestión.

Finalmente, la destacada actividad antibiofilm, particularmente frente a *P. aeruginosa*, respalda la exploración de aplicaciones no alimentarias, como formulaciones tópicas. Asimismo, sería valioso incorporar estudios de mecanismos de acción como interferencia del quorum sensing, junto a evaluaciones adicionales de eficacia y seguridad, al tiempo que refuerza el potencial de estas mieles como un recurso diferenciable que contribuya al desarrollo local y a la conservación de ecosistemas nativos.

## 7. Referencias

- Abou-Shaara, H. F. (2014). The foraging behaviour of honey bees, *Apis mellifera*: A review. *Veterinarni Medicina*, 59(1), 1–10. <https://doi.org/10.17221/7240-VETMED>
- Altier, N., & Abreo, E. (2020). One health: considerations in the International Year of Plant Health. *Agrociencia Uruguay*, 24(NE 2), e422. <https://doi.org/10.31285/AGRO.24.422>
- Acevedo, F., Torres, P., Oomah, B. D., de Alencar, S. M., Massarioli, A. P., Martín-Venegas, R., Albarral-Ávila, V., Burgos-Díaz, C., Ferrer, R., & Rubilar, M. (2017). Volatile and non-volatile/semi-volatile compounds and in vitro bioactive properties of Chilean Ulmo (*Eucryphia cordifolia* Cav.) honey. *Food Research International*, 94, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.01.021>
- Albaridi, N. A. (2019). Antibacterial potency of honey. *International Journal of Microbiology*, 2019, 2464507. <https://doi.org/10.1155/2019/2464507>
- Alcoléa, M., Santana Junior, M. B., Oliveira, K. A. de M., Tussolini, L., Leite, M. A. G., Honorio-França, A. C., França, E. L., & Pertuzatti, P. B. (2024). Bioactive compounds of honey from different regions of Brazil: The effect of simulated gastrointestinal digestion on antioxidant and antimicrobial properties. *Food & Function*, 15(3), 1310–1322. <https://doi.org/10.1039/D3F003620K>
- Alevia, M., Rasines, S., Cantero, L., Sancho, M. T., Fernández-Muiño, M. A., & Osés, S. M. (2021). Chemical extraction and gastrointestinal digestion of honey: Influence on its antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities. *Foods*, 10(6), 1412. <https://doi.org/10.3390/foods10061412>
- Aleixo, M.L.M., da Cruz Mendonça, J., Benevides, R.B.R., Lemos, L.M.S. and Galbiati, C. (2025) Combined Effect of Honey from Central West Brazil on Bacterial Membrane Permeability. *Journal of Biosciences and Medicines*, 13, 316-337. doi: 10.4236/jbm.2025.131026.
- Alqarni, A. S., Owayss, A. A., Mahmoud, A. A., & Hannan, M. A. (2014). Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18(5), 618–625. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.11.009>
- Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Díaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., Damiani, E., Astolfi, P., Bompadre, S., & Battino, M. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8–9), 2490–2499. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.021>

- Alshaybawee, M. R., Asgari, S., Ghadersoltani, P., Mehrabian, A., & Saniee, P. (2025). Exploring the antibacterial and anti-biofilm activity of two Iranian medical-grade kinds of honey on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/S12906-025-04778-1>
- Al-Waili, N., Al Ghamdi, A., Ansari, M. J., Al-Attal, Y., Al-Mubarak, A., & Salom, K. (2013). Differences in composition of honey samples and their impact on the antimicrobial activities against drug multiresistant bacteria and pathogenic fungi. *Archives of Medical Research*, 44(4), 307–316. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.04.009>
- Azman, K. F., Aziz, C. B. A., Zakaria, R., Ahmad, A. H., Shafin, N., & Ismail, C. A. N. (2021). Tualang honey: A decade of neurological research. *Molecules*, 26(17), 5424. <https://doi.org/10.3390/molecules26175424>
- Balázs, V. L., Nagy-Radványi, L., Filep, R., Kerekes, E., Kocsis, B., Kocsis, M., & Farkas, Á. (2021). In vitro antibacterial and antibiofilm activity of Hungarian honeys against respiratory tract bacteria. *Foods*, 10(7), 1632. <https://doi.org/10.3390/foods10071632>
- Bazaid, A. S., Aldarhami, A., Patel, M., Adnan, M., Hamdi, A., Snoussi, M., Qanash, H., Imam, M., Monjed, M. K., & Khateb, A. M. (2022). The antimicrobial effects of Saudi Sumra honey against drug resistant pathogens: Phytochemical analysis, antibiofilm, anti-quorum sensing, and antioxidant activities. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1212. <https://doi.org/10.3390/ph15101212>
- Beckh, G., & Camps, G. (2009). New specifications for unifloral honey. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 105, 105–110.
- Berenbaum, M. R., & Calla, B. (2021). Honey as a functional food for *Apis mellifera*. *Annual Review of Entomology*, 66, 185–208. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-040320-074933>
- Bertoncelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M., & Golob, T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 105(2), 822–828. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.060>
- Bezerra, A., Alves, M. J., Saavedra, M. J., Russo-Almeida, P., Aires, A., Fonseca, H., Rodrigues, F., Delerue-Matos, C., Garcia, J., & Gouvinhas, I. (2024). Anti-biofilm properties of Portuguese honeys against multi-drug resistant microorganisms: A promising strategy for chronic wounds healing. *Food Bioscience*, 61, 104796. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104796>
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: A review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 677–689. <https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719745>
- Bogdanov, S. (2009). *Harmonised methods of the International Honey Commission*. International Honey Commission. [http://www.phadebas.com/applications/food/distase\\_in\\_honey](http://www.phadebas.com/applications/food/distase_in_honey)

- Bogdanov, S. (2011). *A short history of honey: Prehistoric times*. <https://s66a5b07cb261a6cc.jimcontent.com/download/version/1587470939/module/11111982973/name/1HoneyHistory.pdf>
- Brcina, Tijana & Halilčević, Lejla & Cvrk, Ramzija. (2021). Assessment of Honey Quality from the Middle Podrinje Area. *International Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology*, 8. 132-137. 10.31033/ijrasb.8.1.15.
- Brelis, L. E., Genevois, C. E., Primost, D., & Busch, V. M. (2023). Geographical differentiation of honeys from Entre Ríos (Argentina) through physicochemical analysis: A scientific approach for the characterization and authentication of regional honeys. *Biology and Life Sciences Forum*, 26(1), 53. <https://doi.org/10.3390/foods2023-15075>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Brudzynski, K. (2006). Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(12), 1228–1237. <https://doi.org/10.1139/W06-086>
- Brudzynski, K., Abubaker, K., St-Martin, L., & Castle, A. (2011). Re-examining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey. *Frontiers in Microbiology*, 2, 213. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00213>
- Brudzynski, K., & Lannigan, R. (2012). Mechanism of honey bacteriostatic action against MRSA and VRE involves hydroxyl radicals generated from honey's hydrogen peroxide. *Frontiers in Microbiology*, 3, 36. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00036>
- Brudzynski, K. (2020). A current perspective on hydrogen peroxide production in honey: A review. *Food Chemistry*, 332, 127229. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127229>
- Brudzynski, K. (2021). Honey as an ecological reservoir of antibacterial compounds produced by antagonistic microbial interactions in plant nectars, honey and honey bee. *Antibiotics*, 10(5), 551. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050551>
- Brudzynski, K., & Sjaarda, C. P. (2021). Colloidal structure of honey and its influence on antibacterial activity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 2063–2080. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12720>
- Brudzynski, K. (2023). Unexpected value of honey color for prediction of a non-enzymatic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and honey antibacterial activity: A perspective. *Metabolites*, 13(4), 526. <https://doi.org/10.3390/metabo13040526>

- Brussa, C. & Grela, I. (2007). *Flora arbórea del Uruguay: con énfasis en las especies de Rivera y Tacuarembó*. 544. [https://books.google.com/books/about/Flora\\_arb%C3%B3rea\\_del\\_Uruguay.html?hl=es&id=jC9FAQAIAAJ](https://books.google.com/books/about/Flora_arb%C3%B3rea_del_Uruguay.html?hl=es&id=jC9FAQAIAAJ)
- Bryant, V. M., & Jones, G. D. (2001). The r-values of honey: Pollen coefficients. *Palynology*, 25(1), 11–28. <https://doi.org/10.1080/01916122.2001.9989554>
- Bucekova, M., Jardekova, L., Juricova, V., Bugarova, V., Di Marco, G., Gismondi, A., Leonardi, D., Farkasovska, J., Godocikova, J., Lahó, M., Kludiny, J., Majtan, V., Canini, A., & Majtan, J. (2019). Antibacterial activity of different blossom honeys: New findings. *Molecules*, 24(8), 1573. <https://doi.org/10.3390/molecules24081573>
- Bucekova, M., Godocikova, J., Gueyte, R., Chambrey, C., & Majtan, J. (2023). Characterisation of physicochemical parameters and antibacterial properties of New Caledonian honeys. *PLOS ONE*, 18(10), e0293730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0293730>
- Carámbula, M., & Terra, J. A. (2000). *Las sequías: antes, durante y después* (Boletín de Divulgación No. 74). Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). ISBN 9974-38-116-9
- Carter, D. A., Blair, S. E., Cokcetin, N. N., Bouzo, D., Brooks, P., Schothauer, R., & Harry, E. J. (2016). Therapeutic manuka honey: No longer so alternative. *Frontiers in Microbiology*, 7, 569. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00569>
- Candiracci, M., Citterio, B., Diamantini, G., Blasa, M., Accorsi, A., & Piatti, E. (2011). Honey flavonoids, natural antifungal agents against *Candida albicans*. *International Journal of Food Properties*, 14(4), 799–808. <https://doi.org/10.1080/10942910903453355>
- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., & Pérez-Coello, M. S. (2006). Volatile composition and contribution to the aroma of Spanish honeydew honeys: Identification of a new chemical marker. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13), 4809–4813. <https://doi.org/10.1021/jf0604384>
- Cavalheiro, M., & Teixeira, M. C. (2018). *Candida* biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. *Frontiers in Medicine*, 5, 28. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00028>
- Chataway, H. D. (1932). The determination of moisture in honey. *Canadian Journal of Research*, 6(5), 532–547. <https://doi.org/10.1139/cjr32-041>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically* (10th ed.).
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi* (3rd ed.).

- Codex Alimentarius Commission. (2001). *Codex standard for honey (CODEX STAN 12-1981)*.
- Cokcetin, N. N., Pappalardo, M., Campbell, L. T., Brooks, P., Carter, D. A., Blair, S. E., & Harry, E. J. (2016). The antibacterial activity of Australian *Leptospermum* honey correlates with methylglyoxal levels. *PLOS ONE*, *11*(12), e0167780. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167780>
- Combarros-Fuertes, P., Fresno, J. M., Estevinho, M. M., Sousa-Pimenta, M., Tornadijo, M. E., & Estevinho, L. M. (2020). Honey: Another alternative in the fight against antibiotic-resistant bacteria? *Antibiotics*, *9*(11), 774. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110774>
- Cooper, R. A., Molan, P. C., & Harding, K. G. (1999). Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. *Journal of the Royal Society of Medicine*, *92*(6), 283–285. <https://doi.org/10.1177/014107689909200604>
- Cortelezzi, Á., Rava, C., Gutiérrez Silva, S., Mila, F., Gorga, L., Laguna, H., Barboza, N., & Ackermann, M. N. (2023). Impactos del déficit hídrico 2022–2023 en la producción agropecuaria. En Oficina de Programación y Política Agropecuaria (OPYPA) (Ed.), *Anuario OPYPA 2023* (pp. 1–12). Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. <https://descargas.mgap.gub.uy/OPYPA/Anuarios/Anuarioopypa2023/estudios/1/e1web/1EImpactos.pdf>
- Cracco, P., Cabrera, C., Cadenazzi, M., Galietta Positano, G., Moreni, A., Santos, E., & Zaccari, F. (2022). Uruguayan honey from different regions: Characterization and origin markers. *Agrociencia Uruguay*, *26*(1), e947. <https://doi.org/10.31285/AGRO.26.947>
- Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, *196*, 309–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>
- Dirección Nacional de Impresiones y Publicaciones Oficiales, IMPO (2006). *Decreto N° 29/006*. <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/29-2006>
- Dirección Nacional de Impresiones y Publicaciones Oficiales, IMPO. (2013). *Decreto N° 371/013*. <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/371-2013>
- Dirección Nacional de Impresiones y Publicaciones Oficiales, IMPO. (2014). *Decreto N° 343/014*. <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/343-2014>
- Escuredo, O., Silva, L. R., Valentão, P., Seijo, M. C., & Andrade, P. B. (2012). Assessing *Rubus* honey value: Pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity. *Food Chemistry*, *130*(3), 671–678. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.107>
- Escuredo, O., Míguez, M., Fernández-González, M., & Seijo, M. C. (2013). Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chemistry*, *138*(2–3), 851–856. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.015>

- Estevez, M. B., Raffaelli, S., Mitchell, S. G., Faccio, R., & Alborés, S. (2020). Biofilm eradication using biogenic silver nanoparticles. *Molecules*, 25(9), 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules25092023>
- Estevinho, L., Pereira, A. P., Moreira, L., Dias, L. G., & Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3774–3779. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.09.062>
- FAO, UNEP, WHO, & WHOA. (2022). One health joint plan of action (2022–2026): working together for the health of humans, animals, plants and the environment. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240059139>
- Farkas, Á., Balázs, V. L., Kőszegi, T., Csepregi, R., Kerekes, E., Horváth, G., Szabó, P., Gaál, K., & Kocsis, M. (2022). Antibacterial and Biofilm Degradation Effects of Hungarian Honeys Linked With Botanical Origin, Antioxidant Capacity and Mineral Content. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.953470>,
- Feknous, N., & Boumendjel, M. (2022). Natural bioactive compounds of honey and their antimicrobial activity. *Czech Journal of Food Sciences*, 40(3), 163–178. <https://doi.org/10.17221/247/2021-CJFS>
- Fels, D. I., Blackler, A., Cook, D., & Foth, M. (2019). Ergonomics in apiculture: A case study based on inspecting movable frame hives for healthy bee activities. *Heliyon*, 5(7), e01973. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01973>
- Fernandes, L., Ribeiro, H., Oliveira, A., Sanches Silva, A., Freitas, A., Henriques, M., & Rodrigues, M. E. (2021). Portuguese honeys as antimicrobial agents against *Candida* species. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 11(2), 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2020.02.007>
- Freeman, K. K., Valencia, V., Marzaroli, J., & van Zanten, H. H. E. (2022). Digital traceability to enhance circular food systems and reach agriculture emissions targets. *Outlook on Agriculture*, 51(4), 414–422. <https://doi.org/10.1177/00307270221133854>
- French, V. M., Cooper, R. A., & Molan, P. C. (2005). The antibacterial activity of honey against coagulase-negative staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), 228–231. <https://doi.org/10.1093/jac/dki193>
- George, E. M., Gannabathula, S., Lakshitha, R., Liu, Y., Kantono, K., & Hamid, N. (2025). Antibacterial Properties, Arabinogalactan Proteins, and Bioactivities of New Zealand Honey. *Antioxidants*, 14(4), 375. <https://doi.org/10.3390/antiox14040375>
- Gheldof, N., & Engeseth, N. J. (2002). Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3050–3055. <https://doi.org/10.1021/jf0114637>

- Girma, A., Seo, W., & She, R. C. (2019). Antibacterial activity of varying UMF-graded Manuka honeys. *PLOS ONE*, *14*(10), e0224495. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224495>
- Gkoutzouvelidou, M., Panos, G., Xanthou, M. N., Papachristoforou, A., & Giaouris, E. (2021). Comparing the antimicrobial actions of Greek honeys from the Island of Lemnos and Manuka honey from New Zealand against clinically important bacteria. *Foods*, *10*(6), 1402. <https://doi.org/10.3390/foods10061402>
- Godoy, A., Bonini, A., Fariña, L., Sixto, A., Daners, G., & Dellacassa, E. (2024). Exploring the diversity of Uruguayan native flora honeys. *Agrociencia Uruguay*, *28*, e1450. <https://doi.org/10.31285/AGRO.28.1450>
- Grecka, K., Kuś, P. M., Worobo, R. W., & Szweda, P. (2018). Study of the anti-staphylococcal potential of honeys produced in Northern Poland. *Molecules*, *23*(2), 260. <https://doi.org/10.3390/molecules23020260>
- Gruznov, D. V., Gruznova, O. A., Sokhlikov, A. B., Lobanov, A. V., & Chesnokova, I. P. (2024). Changes in the chemical composition and antimicrobial activity of linden, buckwheat and sunflower honey stored at low temperatures. *Current Research in Nutrition and Food Science*, *12*(2), 824–840. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.12.2.27>
- Guttentag, A., Krishnakumar, K., Cokcetin, N., Harry, E., & Carter, D. (2021). Factors affecting the production and measurement of hydrogen peroxide in honey samples. *Access Microbiology*, *3*(3). <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000198>
- Harbane, S., Escuredo, O., Saker, Y., Ghorab, A., Nakib, R., Rodríguez-Flores, M. S., Ouelhadj, A., & Seijo, M. C. (2024). The contribution of botanical origin to the physicochemical and antioxidant properties of Algerian honeys. *Foods*, *13*(4), 573. <https://doi.org/10.3390/foods13040573>
- Henriques, A. F., Jenkins, R. E., Burton, N. F., & Cooper, R. A. (2011). The effect of manuka honey on the structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *30*(2), 167–171. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-1065-1>
- Hulea, A., Obiștioiu, D., Cocan, I., Alexa, E., Negrea, M., Neacșu, A. G., Hulea, C., Pascu, C., Costinar, L., Iancu, I., Tîrziu, E., & Herman, V. (2022). Diversity of monofloral honey based on the antimicrobial and antioxidant potential. *Antibiotics*, *11*(5), 595. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050595>
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Proapi, & Ministerio de Agricultura, G. y P. P. de la N. (2019). Guía para la caracterización de mieles argentinas. ISBN 978-987-47099-2-9.
- Irish, J., Carter, D. A., Shokohi, T., & Blair, S. E. (2006). Honey has an antifungal effect against *Candida* species. *Medical Mycology*, *44*(3), 289–291. <https://doi.org/10.1080/13693780500417037>

- Jiang, X., Lin, A., Li, S., Shi, Y., Zhou, F., Gomez, G. F., Gregory, R. L., Zhang, C., Chen, S., & Huang, R. (2022). Effects of artificial honey and epigallocatechin-3-gallate on *Streptococcus pyogenes*. *BMC Microbiology*, 22(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12866-022-02611-0>
- Jones, G. D., & Bryant, Jr, V. M. (2004). The use of ETOH for the dilution of honey. *Grana*, 43(3), 174–182. <https://doi.org/10.1080/00173130410019497>
- Kaźmierczak-Barańska, J., & Karwowski, B. T. (2024). The antioxidant potential of commercial Manuka honey from New Zealand-Biochemical and cellular studies. *Current Issues in Molecular Biology*, 46(7), 6366–6376. <https://doi.org/10.3390/cimb46070380>
- Khataybeh, B., Jaradat, Z., & Ababneh, Q. (2023). Anti-bacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities of honey: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 317, 116830. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116830>
- Kwakman, P. H. S., te Velde, A. A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, M. J. E., & Zaat, S. A. J. (2010). How honey kills bacteria. *The FASEB Journal*, 24(7), 2576–2582. <https://doi.org/10.1096/fj.09-150789>
- Kwakman, P. H. S., te Velde, A. A., de Boer, L., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., & Zaat, S. A. J. (2011). Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity. *PLOS ONE*, 6(3), e17709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017709>
- Kunat-Budzyńska, M., Rysiak, A., Wiater, A., Graż, M., Andrejko, M., Budzyński, M., Bryś, M. S., Sudziński, M., Tomczyk, M., Gancarz, M., Rusinek, R., & Ptaszyńska, A. A. (2023). Chemical composition and antimicrobial activity of new honey varietals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(3), 2458. <https://doi.org/10.3390/ijerph20032458>
- Ky, I., Lorrain, B., Kolbas, N., Crozier, A., & Teissedre, P. L. (2014). *Wine by-Products: Phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties*. *Molecules*, 19(1), 482–506. <https://doi.org/10.3390/molecules19010482>
- Lawag, I. L., Nolden, E. S., Schaper, A. A. M., Lim, L. Y., & Locher, C. (2023). A modified Folin–Ciocalteu assay for the determination of total phenolic content in honey. *Applied Sciences*, 13, 2135. <https://doi.org/10.3390/app13042135>
- Lehmann, D. M., Krishnakumar, K., Batres, M. A., Hakola-Parry, A., Cokcetin, N., Harry, E., & Carter, D. A. (2019). A cost-effective colourimetric assay for quantifying hydrogen peroxide in honey. *Access Microbiology*, 1(10). <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000065>
- Lima, W. G., Moreira Brito, J. C., da Cruz Nizer, W. S., & de Assis, D. C. S. (2022). Antifungal, antibiofilm and anti-resistance activities of Brazilian monofloral honeys against *Candida* spp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 42, 102335. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102335>

- Loveaux, J., Maurizio, A. y Vorwohl, G., 1978. Methods of melissopalynology. En: Bee Word, (59), pp.139-157.
- Lu, J., Cokcetin, N. N., Burke, C. M., Turnbull, L., Liu, M., Carter, D. A., Whitchurch, C. B., & Harry, E. J. (2019). Honey can inhibit and eliminate biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54576-2>
- Lusby, P. E., Coombes, A. L., & Wilkinson, J. M. (2005). Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Archives of Medical Research*, 36(5), 464–467. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.03.038>
- Machado, A. M., Miguel, M. G., Vilas-Boas, M., & Figueiredo, A. C. (2020). Honey volatiles as a fingerprint for botanical origin-A review on their occurrence on monofloral honeys. *Molecules*, 25(2), 374. <https://doi.org/10.3390/molecules25020374>
- Magoshi, I. B., Nekhumbe, A. W., Ibrahim, M. A., Serem, J. C., & Bester, M. J. (2023). Gastrointestinal effects on the antioxidant and immunomodulatory properties of South African Fynbos honey. *International Journal of Food Science*, 2023, 2553197. <https://doi.org/10.1155/2023/2553197>
- Marchesi, E., Mailhos, A., & Bonifacino, J. M. (2026). *Terminalia australis* Cambess. En: Marchesi E., Mailhos A. & Bonifacino J.M. (Eds.). *Flora Uruguaya: Flora Vascular del Uruguay*. ISSN 3121-2050, V1.0. [Data set]. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.18316871>
- Mato, I., Huidobro, J. F., Simal-Lozano, J., & Sancho, M. T. (2006). Rapid determination of nonaromatic organic acids in honey by capillary zone electrophoresis with direct ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1541–1550. <https://doi.org/10.1021/jf051757i>
- Masoura, M., Passaretti, P., Overton, T. W., Lund, P. A., & Gkatzionis, K. (2020). Use of a model to understand the synergies underlying the antibacterial mechanism of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing honeys. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74937-6>
- Melhem, M. S. C., Coelho, V. C., Fonseca, C. A., Oliveira, L. d., Bonfietti, L. X., Szeszs, M. W., Magri, M. M. C., Dorneles, F. S., Taguchi, H., Moreira, D. V. S., Motta, A. L., Batista, M. V., Kamei, K., & Shikanai-Yasuda, M. A. (2022). Evaluation of the Sensititre YeastOne and Etest in Comparison with CLSI M38-A2 for Antifungal Susceptibility Testing of Three Azoles, Amphotericin B, Caspofungin, and Anidulafungin, against *Aspergillus fumigatus* and Other Species, Using New Clinical Breakpoints and Epidemiological Cutoff Values. *Pharmaceutics*, 14(10), 2161. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102161>
- MERCOSUR. (1999). *MERCOSUR/GMC/RES N<sup>o</sup> 89/99: Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y Calidad de la Miel*. XXXVI GMC - Montevideo, 18/XI/99 [En línea]. Montevideo: IMPO. <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-internacional/105-2001>

- Ministry for Primary Industries. (2021). *Apiculture: 2020 apiculture monitoring programme*. <https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/44068-Apiculture-Moniotoring-Report-2020>
- Ministerio de Ambiente. (2022). *Plan de manejo: Área con recursos manejados*. [https://www.gub.uy/ministerio-ambiente/sites/ministerio-ambiente/files/documentos/publicaciones/PM\\_Queguay\\_final.pdf](https://www.gub.uy/ministerio-ambiente/sites/ministerio-ambiente/files/documentos/publicaciones/PM_Queguay_final.pdf)
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, MGAP. (2010). *Manual de procedimientos operativos estandarizados (v1)*. [https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/publicaciones/manualpoesparasalasdeextracciondemiel.junio2010\\_0.pdf](https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/publicaciones/manualpoesparasalasdeextracciondemiel.junio2010_0.pdf)
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). (2021). Consumo de miel en Uruguay. Recuperado el 21 de agosto de 2025, de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/datos/consumo-miel-uruguay-0>
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. (2025). *Sector apícola: situación y perspectivas*. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/noticias/sector-apicola-situacion-perspectivas>
- Mokhtar, J. A., McBain, A. J., Ledder, R. G., Binsuwaidan, R., Rimmer, V., & Humphreys, G. J. (2020). Exposure to a Manuka honey wound gel is associated with changes in bacterial virulence and antimicrobial susceptibility. *Frontiers in Microbiology, 11*, 568070. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02036>
- Molan, P. C. (1992). The antibacterial activity of honey. *Bee World, 73*(2), 59–76. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1992.11099118>
- Molan, P. C. (2006). The evidence supporting the use of honey as a wound dressing. *International Journal of Lower Extremity Wounds, 5*(1), 40–54. <https://doi.org/10.1177/1534734605286014>
- Montenegro, G., Gómez, M., Casaubon, G., Belancic, A., Mujica, A. M., & Peña, R. C. (2009). *Analysis of volatile compounds in three unifloral native Chilean honeys*. *Phyton-International Journal of Experimental Botany, 78*, 61–65. <https://doi.org/10.32604/phyton.2009.78.067>
- Montenegro, G., Santander, F., Jara, C., Nuñez, G., & Fredes, C. (2013). Actividad antioxidante y antimicrobiana de mieles monoflorales de plantas nativas chilenas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 12*(3), 257–268.
- Mudenda, S., Hikaambo, C. N. A., Chabalenge, B., Mfunne, R. L., Mufwambi, W., Ngazimbi, M., Matafwali, S., & Daka, V. (2023). Antibacterial activities of honey against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: A potential treatment for bacterial infections and alternative to antibiotics. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 12*(3), 06–13. <https://doi.org/10.22271/phyto.2023.v12.i3a.14655>

- Nadar, S., Khan, T., Patching, S. G., & Omri, A. (2022). Development of Antibiofilm Therapeutics Strategies to Overcome Antimicrobial Drug Resistance. *Microorganisms* 2022, Vol. 10, Page 303, 10(2), 303. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10020303>
- Nan, A., Mituletu, M., Dumitrescu, G., Caraba, I. V., Pet, I., Sinitean, A., Matica, M. A., Liliana, P. C., Pet, E., Popescu, R., & Caraba, M. N. (2025). Antimicrobial and Biofilm Inhibiting Potential of Two Romanian Linden Honeys. *Foods* 2025, Vol. 14, 14(21). <https://doi.org/10.3390/foods14213594>
- Naghavi, M., Vollset, S. E., Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Gray, A. P., Wool, E. E., Robles Aguilar, G., Mestrovic, T., Smith, G., Han, C., Hsu, R. L., Chalek, J., Araki, D. T., Chung, E., Raggi, C., Gershberg Hayoon, A., Davis Weaver, N., Lindstedt, P. A., Smith, A. E., ... Murray, C. J. L. (2024). Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*, 404(10459), 1199–1226. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)01867-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01867-1)
- Nakamura, T., Miyamoto, H., & Endo, J. (2003). Characteristics of pharmaceuticals in “Heji Jufang”. *Yakushigaku Zasshi*, 38(2), 185–192. <https://europepmc.org/article/med/15146841>
- Nassar, H. M., Li, M., & Gregory, R. L. (2012). Effect of honey on *Streptococcus mutans* growth and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(2), 536–540. <https://doi.org/10.1128/AEM.05538-11>
- Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., & Pulkrabek, J. (2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*, 20(2), 157–160. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.03.007>
- Nolan, V. C., Harrison, J., & Cox, J. A. G. (2019). Dissecting the antimicrobial composition of honey. *Antibiotics*, 8(4), 251. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040251>
- Nozal, M. J., Bernal, J. L., Gómez, L. A., Higes, M., & Meana, A. (2003). Determination of oxalic acid and other organic acids in honey and in some anatomic structures of bees. *Apidologie*, 34(2), 181–188. <https://doi.org/10.1051/apido:2003001>
- Núñez-Gómez, V., González-Barrio, R., & Periago, M. J. (2023). Interaction between dietary fibre and bioactive compounds in plant by-products: Impact on bioaccessibility and bioavailability. *Antioxidants*, 12(4), 976. <https://doi.org/10.3390/antiox12040976>
- Ogwu, M. C., & Izah, S. C. (2025). Honey as a natural antimicrobial. *Antibiotics*, 14(3), 255. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14030255>
- Ordóñez, A. L., Balanza, M. E., & Chiralt, A. (2005). Prolina y nitrógeno total en mieles poliflorales frescas y almacenadas a distintas temperaturas. *Información Tecnológica*, 16(5), 11–16. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642005000500003>

- Organización Panamericana de la salud. (2023). *Resistencia antimicrobiana: una amenaza real - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*.  
<https://www.paho.org/es/noticias/21-11-2023-resistencia-antimicrobiana-amenaza-real>
- Osés, S. M., Rodríguez, C., Valencia, O., Fernández-Muiño, M. A., & Sancho, M. T. (2024). Relationships among hydrogen peroxide concentration, catalase, glucose oxidase, and antimicrobial activities of honeys. *Foods*, 13(9), 1344.  
<https://doi.org/10.3390/foods13091344>
- O'Sullivan, A. M., O'Callaghan, Y. C., O'Connor, T. P., & O'Brien, N. M. (2013). Comparison of the antioxidant activity of commercial honeys, before and after in-vitro digestion. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 63(3). <https://doi.org/10.2478/v10222-012-0080-6>
- Pandey, R., Mishra, S. K., & Shrestha, A. (2021). Characterisation of ESKAPE pathogens with special reference to multidrug resistance and biofilm production in a Nepalese hospital. *Infection and Drug Resistance*, 14, 2201–2212.  
<https://doi.org/10.2147/IDR.S306688>
- Pereyra, F. (2024). *Sector apícola: Situación y perspectivas*.  
<https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/noticias/sector-apicola-situacion-perspectivas>
- Pippinato, L.; Blanc, S.; Mancuso, T.; Brun, F. (2020) A Sustainable Niche Market: How Does Honey Behave? *Sustainability*, 12, 10678.  
<https://doi.org/10.3390/su122410678>
- Pleeging, C. C. F., Coenye, T., Mossialos, D., de Rooster, H., Chrysostomou, D., Wagener, F. A. D. T. G., & Cremers, N. A. J. (2020). Synergistic antimicrobial activity of supplemented medical-grade honey against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and eradication. *Antibiotics*, 9(12), 866. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120866>
- Proaño, A., Coello, D., Villacrés-Granda, I., Ballesteros, I., Debut, A., Vizuite, K., Brenciani, A., & Álvarez-Suarez, J. M. (2021). The osmotic action of sugar combined with hydrogen peroxide and bee-derived antibacterial peptide defensin-1 is crucial for the antibiofilm activity of eucalyptus honey. *LWT*, 136, 110379.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110379>
- Raffaelli, S., Abreo, E., Altier, N., Vázquez, Á., & Alborés, S. (2022). Bioprospecting the antibiofilm and antimicrobial activity of soil and insect gut bacteria. *Molecules*, 27(6), 2002. <https://doi.org/10.3390/molecules27062002>
- Ranneh, Y., Akim, A. M., Hamid, H. A., Khazaai, H., Fadel, A., Zakaria, Z. A., Albujja, M., & Bakar, M. F. A. (2021). Honey and its nutritional and anti-inflammatory value. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), 1–17.  
<https://doi.org/10.1186/S12906-020-03170-5>

- Reglamento Bromatológico Nacional. (2022). decreto nro. 315/994 de fecha 05/07/1994: anotado y concordado con apéndice normativo. 8a ed. Montevideo: IMPO; 2022.
- Rivera-Mondragón, A., Marrone, M., Bruner-Montero, G., Gaitán, K., de Núñez, L., Otero-Palacio, R., Añino, Y., Wcislo, W. T., Martínez-Luis, S., & Fernández-Marín, H. (2023). Assessment of the quality, chemometric and pollen diversity of *Apis mellifera* honey from different seasonal harvests. *Foods*, 12(19), 3656. <https://doi.org/10.3390/foods12193656>
- Roberts, A. E. L., Maddocks, S. E., & Cooper, R. A. (2015). Manuka honey reduces the motility of *Pseudomonas aeruginosa* by suppression of flagella-associated genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(3), 716–725. <https://doi.org/10.1093/jac/dku448>
- Robinson, N., Harper, R. J., & Smettem, K. R. J. (2006). Soil water depletion by *Eucalyptus* spp. integrated into dryland agricultural systems. *Plant and Soil*, 286(1–2), 141–151. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9032-4>
- Rodríguez Elhordoy, M., Báez, J., Pardo, V., Fernández, A., Gadea, N., Irigaray, B., Pistón, M., Vázquez, D., Medrano, A., & Silva, J. (2025). Lupin (*Lupinus angustifolius*) as a protein-rich emerging crop adapted to Uruguay: Nutritional and functional potential. <https://doi.org/10.22541/au.175918534.46335786/v1>
- Rudrapal, M., Khairnar, S. J., Khan, J., Dukhyil, A. B., Ansari, M. A., Alomary, M. N., Alshabmi, F. M., Palai, S., Deb, P. K., & Devi, R. (2022). Dietary polyphenols and their role in oxidative stress-induced human diseases: Insights into protective effects, antioxidant potentials and mechanism(s) of action. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 806470. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.806470>
- Sánchez-Martín, V., Morales, P., González-Porto, A. V., Iriondo-DeHond, A., López-Parra, M. B., Del Castillo, M. D., Hospital, X. F., Fernández, M., Hierro, E., & Haza, A. I. (2022). Enhancement of the antioxidant capacity of thyme and chestnut honey by addition of bee products. *Foods*, 11(19), 3118. <https://doi.org/10.3390/foods11193118>
- Sancho MT, Pascual-Maté A, Rodríguez-Morales E, Osés SM, Escriche I, Periche Á, Fernández-Muiño MA. (2016) Critical assessment of antioxidant-related parameters of honey. *Int J Food Sci Technol*;51(1):30-6. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12988>
- Sanhueza, J., & Fuentes, E. (2025). Assessment of role of glucose oxidase, flavonoids, copper and iron on the generation of hydrogen peroxide in honey. *Food Research International*, 202. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115532>
- Santos, E. (2020). *Fortalecimiento de las capacidades para la gestión ambientalmente adecuada de plaguicidas incluyendo COPS*. Consultoría en Conservación de Polinizadores. <https://www.gub.uy/ministerio-ambiente/sites/ministerio-ambiente/files/documentos/publicaciones/Producto%201%20-%20Relevamiento%20de%20polinizacion%20y%20polinizadores%20en%20Uruguay.pdf>

- Seraglio, S. K. T., Schulz, M., Gonzaga, L. V., Fett, R., & Costa, A. C. O. (2021). Current status of the gastrointestinal digestion effects on honey: A comprehensive review. *Food Chemistry*, 357, 129807. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129807>
- Sharma, S., Mohler, J., Mahajan, S. D., Schwartz, S. A., Bruggemann, L., & Aalinkeel, R. (2023). Microbial biofilm: A review on formation, infection, antibiotic resistance, control measures, and innovative treatment. *Microorganisms*, 11(6), 1614. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061614>
- Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., Power, A., Gethin, G., Cowman, S., & Humphreys, H. (2010). Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1), 47. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-47>
- Sindi, A., Chawn, M. V. B., Hernandez, M. E., Green, K., Islam, M. K., Locher, C., & Hammer, K. (2019). Anti-biofilm effects and characterisation of the hydrogen peroxide activity of a range of Western Australian honeys compared to Manuka and multifloral honeys. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-54217-8>
- Skadiņš, I., Labsvārds, K. D., Grava, A., Amirian, J., Tomsone, L. E., Ruško, J., Viksna, A., Bandere, D., & Brangule, A. (2023). Antimicrobial and antibiofilm properties of Latvian honey against causative agents of wound infections. *Antibiotics*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050816>
- Socha, R., Juszczak, L., Pietrzyk, S., Gałkowska, D., Fortuna, T., & Witczak, T. (2011). Phenolic profile and antioxidant properties of Polish honeys. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(3), 528–534. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02517.x>
- Strelec, I., Crevar, B., Kovač, T., Bilić Rajs, B., Primorac, L., & Flanjak, I. (2018). Glucose oxidase activity and hydrogen peroxide accumulation in Croatian honeys. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 10(1), 33–41. <https://doi.org/10.17508/CJFST.2018.10.1.06>
- Tan, H. T., Rahman, R. A., Gan, S. H., Halim, A. S., Hassan, S. A., Sulaiman, S. A., & BS, K. K. (2009). The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine 2009 9:1*, 9(1), 34-. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-9-34>
- Tsavea, E., Vardaka, F. P., Savvidaki, E., Kellil, A., Kanelis, D., Bucekova, M., Grigorakis, S., Godocikova, J., Gotsiou, P., Dimou, M., Loupassaki, S., Remoundou, I., Tsadila, C., Dimitriou, T. G., Majtan, J., Tananaki, C., Alissandrakis, E., & Mossialos, D. (2022). Physicochemical Characterization and Biological Properties of Pine Honey Produced across Greece. *Foods*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/foods11070943>

- Trade Map. (2024). *Trade Map – Lista de los países exportadores para el producto seleccionado en 2024 (Miel natural)*. [https://www.trademap.org/Country\\_SelProduct.aspx?nvpm=3%7c%7c%7c%7c%7c0409%7c%7c%7c4%7c1%7c1%7c2%7c1%7c1%7c2%7c1%7c1%7c1%7c1](https://www.trademap.org/Country_SelProduct.aspx?nvpm=3%7c%7c%7c%7c%7c0409%7c%7c%7c4%7c1%7c1%7c2%7c1%7c1%7c2%7c1%7c1%7c1%7c1)
- Ucurum, O., Tosunoglu, H., Takma, Ç., Birlik, P. M., Berber, M., & Kolaylı, S. (2024). Distinctive properties of the pine, oak, chestnut and multiflora blossom and honeydew honeys. *European Food Research and Technology*, 250(6), 1765–1774. <https://doi.org/10.1007/s00217-024-04520-0>
- Valachová, I., Bučková, M., & Majtán, J. (2016). Quantification of bee-derived peptide defensin-1 in honey by competitive enzyme-linked immunosorbent assay: A new approach in honey quality control. *Czech Journal of Food Sciences*, 34(3), 233–243. <https://doi.org/10.17221/422/2015-CJFS>
- Velásquez, P., Montenegro, G., Leyton, F., Ascar, L., Ramirez, O., & Giordano, A. (2020). Bioactive compounds and antibacterial properties of monoflora Ulmo honey. *CYTA – Journal of Food*, 18(1), 11–19. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1701559>
- Visavadia, B. G., Honeysett, J., & Danford, M. H. (2008). Manuka honey dressing: An effective treatment for chronic wound infections. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 46(1), 55–56. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2006.09.013>
- World Health Organization. (2022). *WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>
- World Health Organization. (2024). *WHO methods and data sources for country-level causes of death 2000–2021*. [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/gho-documents/global-health-estimates/ghe2021\\_cod\\_methods.pdf?sfvrsn=dca346b7\\_1](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/gho-documents/global-health-estimates/ghe2021_cod_methods.pdf?sfvrsn=dca346b7_1)

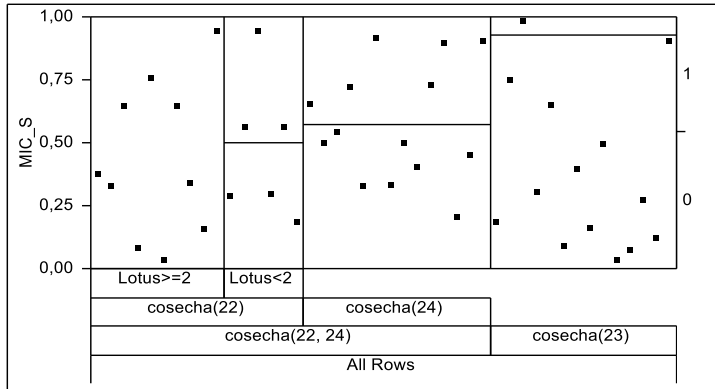
## 8. Anexos

### 8.1. Resultados polínicos

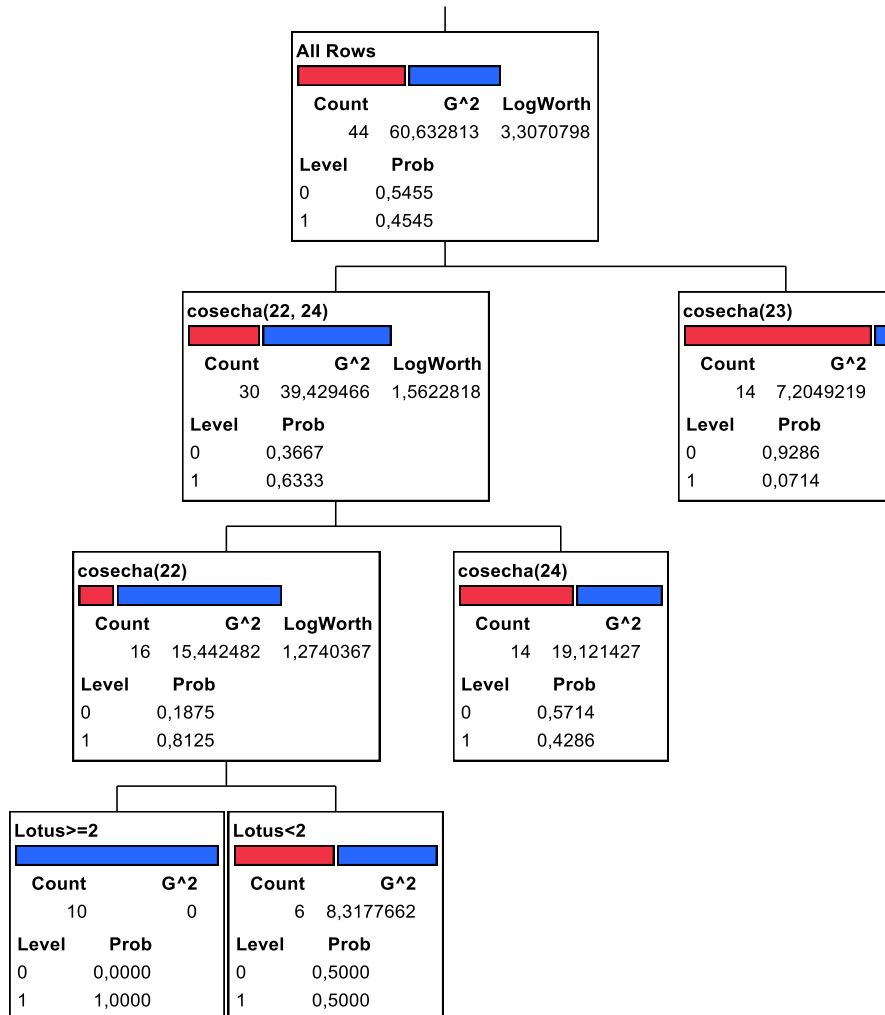
muestras	<i>Eucalyptus</i> <i>spp.</i>	<i>Trifolium</i> <i>sp.</i>	<i>Scutia</i> <i>buxifolia</i>	<i>Blepharocalyx</i> <i>salicifolius</i>	<i>Baccharis</i> <i>spp.</i>	<i>Lotus</i> <i>sp.</i>	<i>Brassicaceae</i>	<i>Terminalia</i> <i>australis</i>	<i>Echium</i> <i>plantagineum</i>	<i>t-Schinus</i> <i>sp.</i>	<i>Ammi</i> <i>visnaga</i>	<i>Eryngium</i> <i>spp.</i>	<i>Myrtaceae</i>	<i>Rumex</i> <i>sp.</i>	<i>Papilionoideae</i>	<i>Sebastiania</i> <i>brasiliensis</i>	<i>Salix</i> <i>sp.</i>	<i>Allophylus</i> <i>edulis</i>	<i>Gleditsia</i> <i>triacanthos</i>	<i>t-Eugenia</i> <i>sp.</i>
22-A1	16,7	14,6	14,1	13,3	7,1	6,3	6,0	4,8	3,4	5,5	0,0	1,5	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22-B1	0,0	0,0	8,7	72,2	0,0	2,0	0,0	2,9	0,0	2,9	0,0	2,9	1,1	3,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22-B2	0,0	13,2	10,6	49,4	0,0	0,0	0,0	18,3	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0
22-C1	2,5	8,5	11,8	14,2	6,1	8,6	0,0	2,5	19,9	6,8	3,3	13,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22-C2	15,1	3,2	8,0	3,4	1,5	3,4	3,2	3,0	8,6	25,0	2,1	10,7	0,0	0,0	0,0	0,0	8,6	0,0	0,0	0,0
22-D1	12,0	1,9	11,2	4,4	3,0	10,3	5,6	4,2	11,0	20,2	1,9	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0	11,1	0,0	0,0	0,0
22-E1	3,9	0,0	6,9	22,5	13,0	16,4	2,7	2,9	6,1	9,3	1,2	1,7	0,0	2,7	2,9	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0
22-F1	0,0	0,0	43,2	20,3	0,0	2,4	0,0	16,6	0,0	5,7	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1	1,1	2,7	0,0	0,0	0,0
22-F2	0,0	0,0	45,9	29,6	0,0	1,6	0,0	17,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22-G1	0,0	0,0	45,7	23,8	0,0	2,1	0,0	18,9	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	2,0	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7
22-H1	0,0	0,0	36,1	25,9	0,0	4,9	0,0	12,0	11,5	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	0,0	0,0	0,0	1,8	0,0
22-I1	0,0	0,0	40,8	23,1	0,0	1,7	0,0	21,0	0,0	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	2,6	0,0	0,0	0,0	2,9	0,0
22-I2	0,0	0,0	40,9	26,9	0,0	1,7	0,0	19,3	0,0	2,1	0,0	0,0	0,0	2,1	1,6	0,0	0,0	0,0	2,1	0,0
22-F3	0,0	0,0	3,2	0,0	2,0	0,0	0,0	2,7	0,0	9,9	0,0	0,0	79,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0
22-F4	1,8	0,0	15,2	0,0	0,0	0,0	0,0	73,2	0,0	0,0	0,0	0,0	7,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22-F5	36,7	0,0	3,1	0,0	28,9	2,6	0,0	1,7	0,0	2,4	0,0	0,0	22,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
23-A1	0,0	1,2	9,6	21,0	0,0	9,1	0,0	5,0	4,9	9,8	0,0	7,6	18,3	3,8	0,0	0,0	2,2	0,0	0,0	0,0
23-B1	0,0	1,5	21,9	21,8	0,0	1,0	0,0	33,8	2,2	0,0	0,0	7,0	5,6	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
23-B2	0,0	1,2	58,1	6,3	0,0	0,0	0,0	24,9	0,0	1,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
23-B3	0,0	0,0	19,3	3,6	0,0	16,0	0,0	59,3	1,4	3,6	0,0	2,3	2,3	1,4	0,0	0,0	1,4	1,6	0,0	0,0
23-G1	0,0	0,0	0,0	83,7	0,0	0,0	0,0	10,4	0,0	0,0	0,0	1,3	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
23-G2	0,0	0,0	11,5	26,1	0,0	0,0	0,0	21,5	0,0	3,1	0,0	2,1	8,5	20,0	0,0	0,0	0,0	2,4	0,0	0,0
23-H1	0,0	0,0	5,0	30,3	0,0	0,0	0,0	21,6	2,4	0,0	0,0	20,6	7,1	2,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
23-H2	0,0	0,0	4,1	18,3	0,0	0,0	0,0	67,5	1,1	0,0	0,0	3,2	2,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
23-F1	22,8	0,0	2,1	60,0	3,1	0,0	0,0	3,1	0,0	0,0	0,0	2,4	0,0	2,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
23-F2	41,5	0,0	2,5	40,2	4,8	0,0	0,0	4,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
23-D1	83,2	0,0	0,0	1,1	7,3	2,0	1,6	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0
23-D2	80,2	0,0	0,0	2,3	7,3	3,4	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
23-E1	85,2	0,0	0,0	0,0	6,4	1,6	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
23-E2	84,6	0,0	0,0	1,3	6,9	2,1	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24-D1	1,1	0,0	24,7	28,5	0,0	3,3	0,0	26,0	6,7	6,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24-D2	0,0	0,0	24,7	28,2	0,0	3,3	0,0	26,1	6,8	5,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0
24-B2	13,9	0,0	19,4	13,1	0,0	0,0	0,0	4,6	0,0	38,5	0,0	0,0	2,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	4,6
24-B3	8,3	0,0	15,4	50,2	0,0	5,7	0,0	7,4	1,4	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,8
24-F1	0,0	0,0	21,0	52,4	0,0	0,0	0,0	15,5	0,0	6,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	1,5
24-F2	0,0	0,0	23,3	53,4	0,0	0,0	0,0	14,8	0,0	4,6	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0
24-F6	0,0	0,0	1,4	60,8	0,0	0,0	0,0	16,9	0,0	4,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	0,0
24-I1	0,0	0,0	5,4	37,2	0,0	0,0	17,3	23,6	1,4	7,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,1	0,0
24-I2	1,0	0,0	5,8	39,2	0,0	0,0	11,4	25,2	1,1	7,9	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,9	0,0
24-E1	0,0	0,0	19,6	51,3	0,0	0,0	0,0	15,7	0,0	6,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8	0,0
24-E2	1,8	0,0	21,1	46,1	0,0	0,0	0,0	16,3	2,2	5,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	1,2
24-G1	0,0	0,0	16,9	75,2	0,0	0,0	0,0	5,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24-H1	0,0	0,0	13,2	63,7	0,0	0,0	0,0	19,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1
24-J1	2,2	0,0	40,9	3,3	0,0	1,1	0,0	1,9	0,0	41,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	0,0	0,0	3,3

## 8.2. Análisis de partición

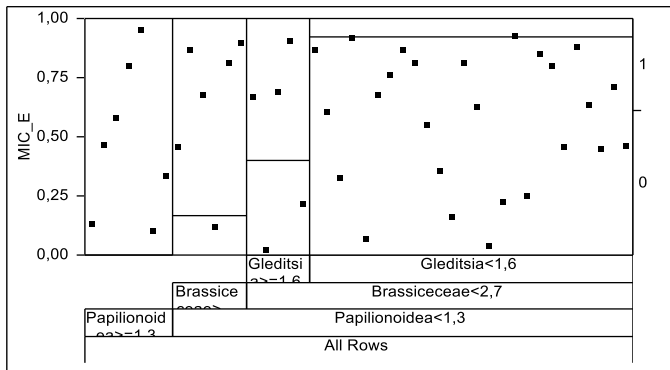
Partition for IC\_S



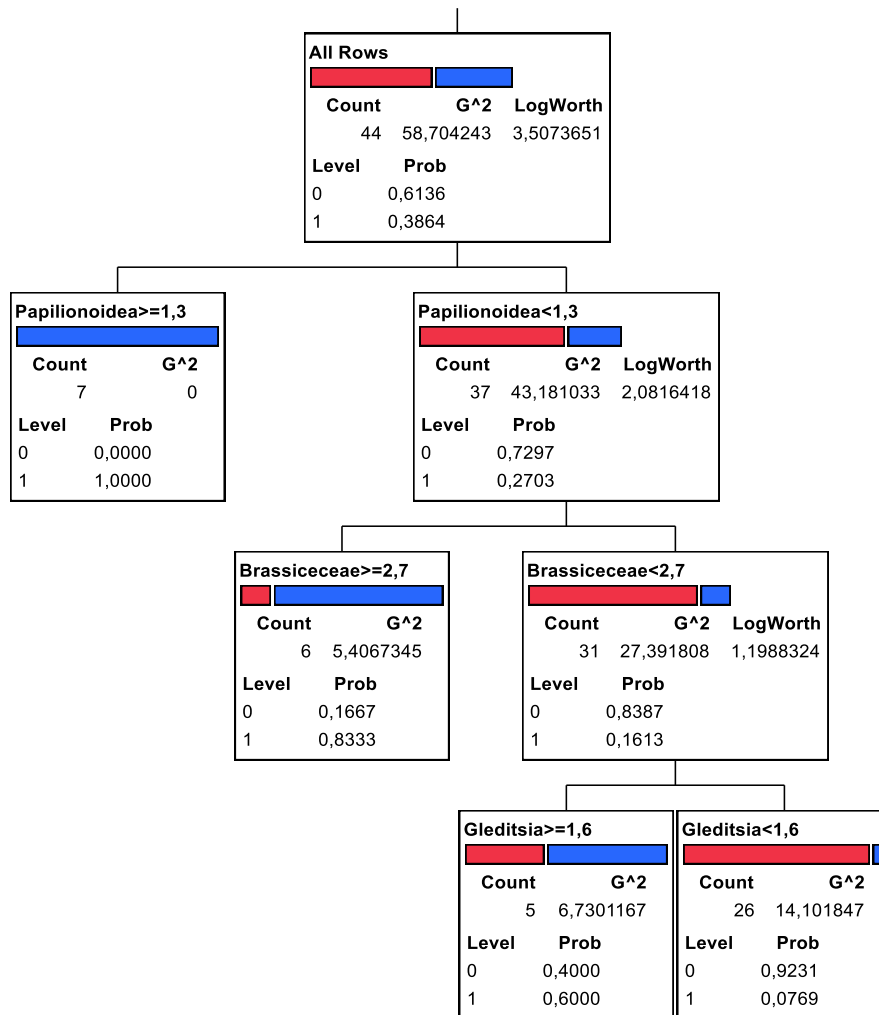
**RSquare**      **N**      **Number of Splits**  
 0,429          44          3



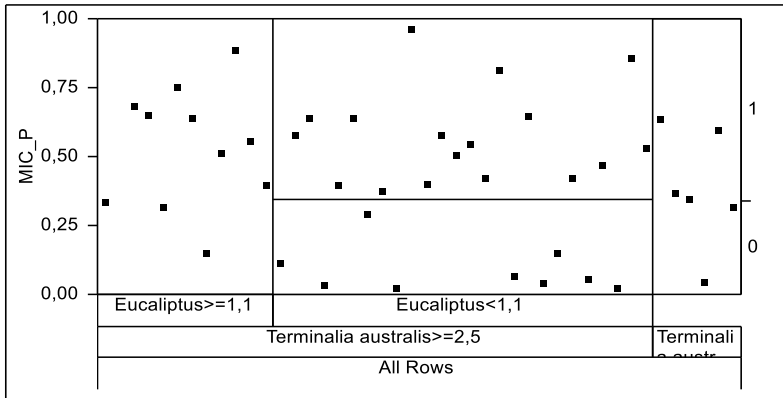
# Partition for IC\_E



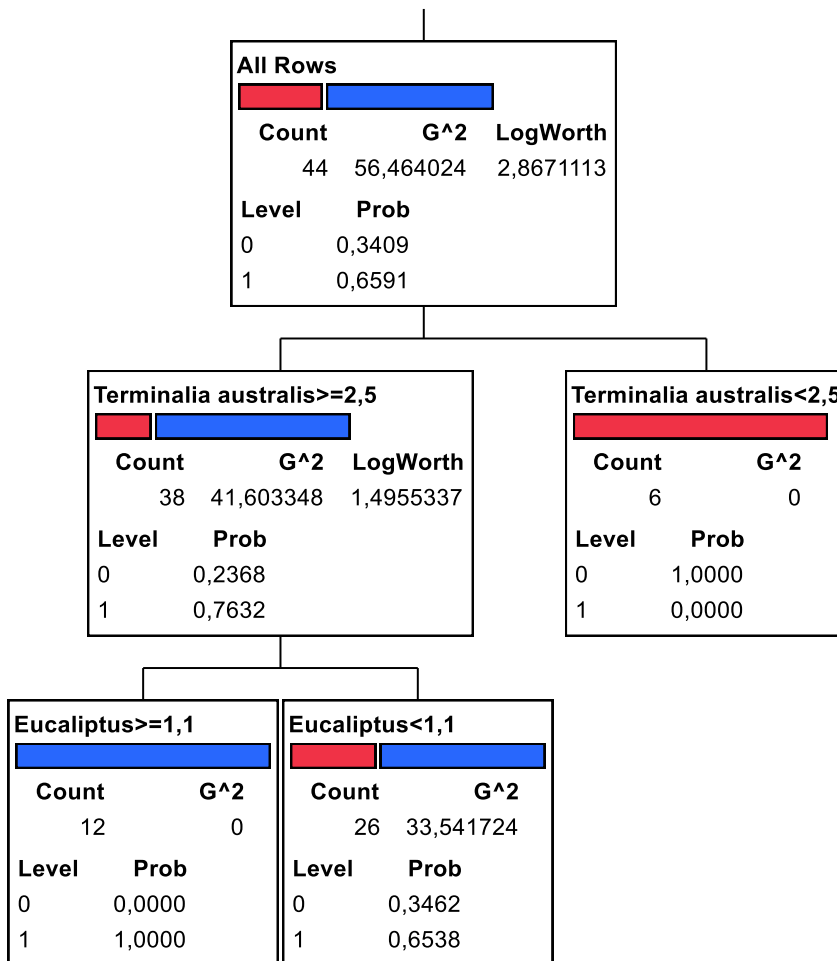
**RSquare**      **N**      **Number of Splits**  
 0,553          44          3



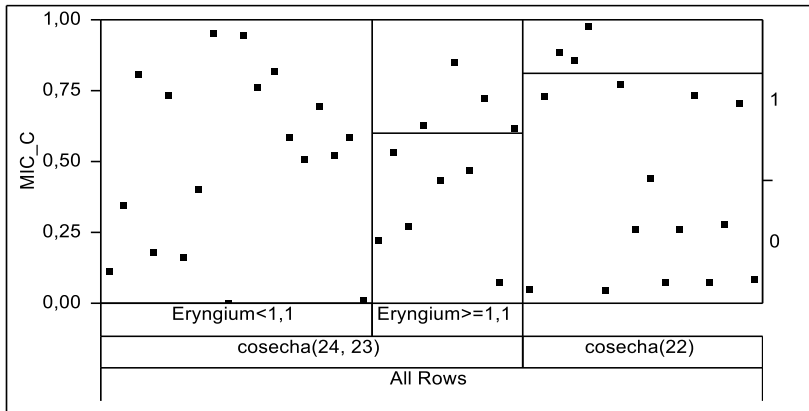
# Partition for IC\_P



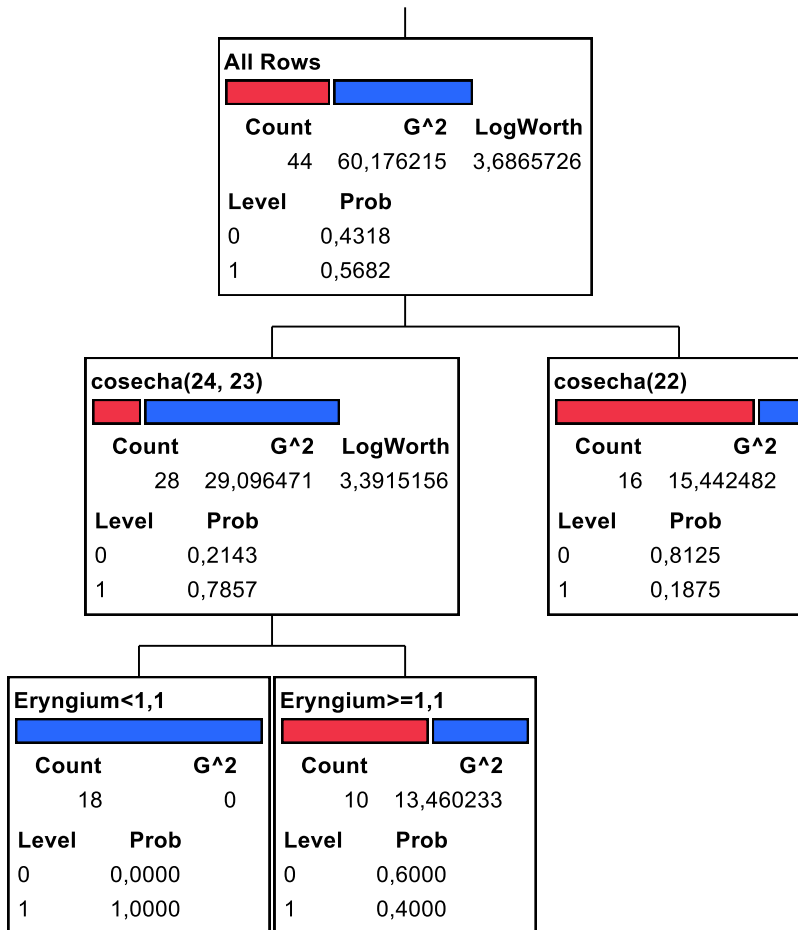
RSquare	N	Number of Splits
0,406	44	2



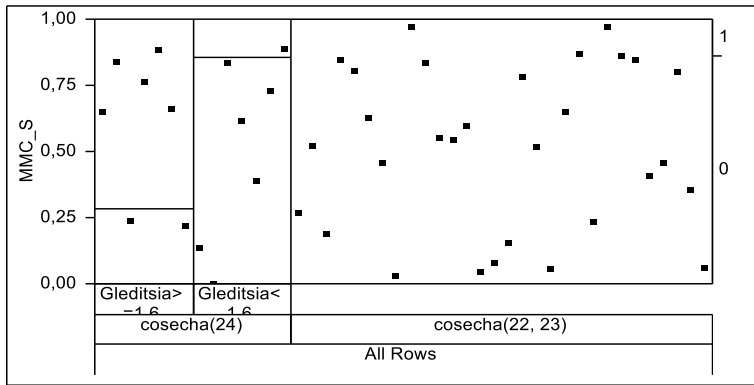
# Partition for IC\_C



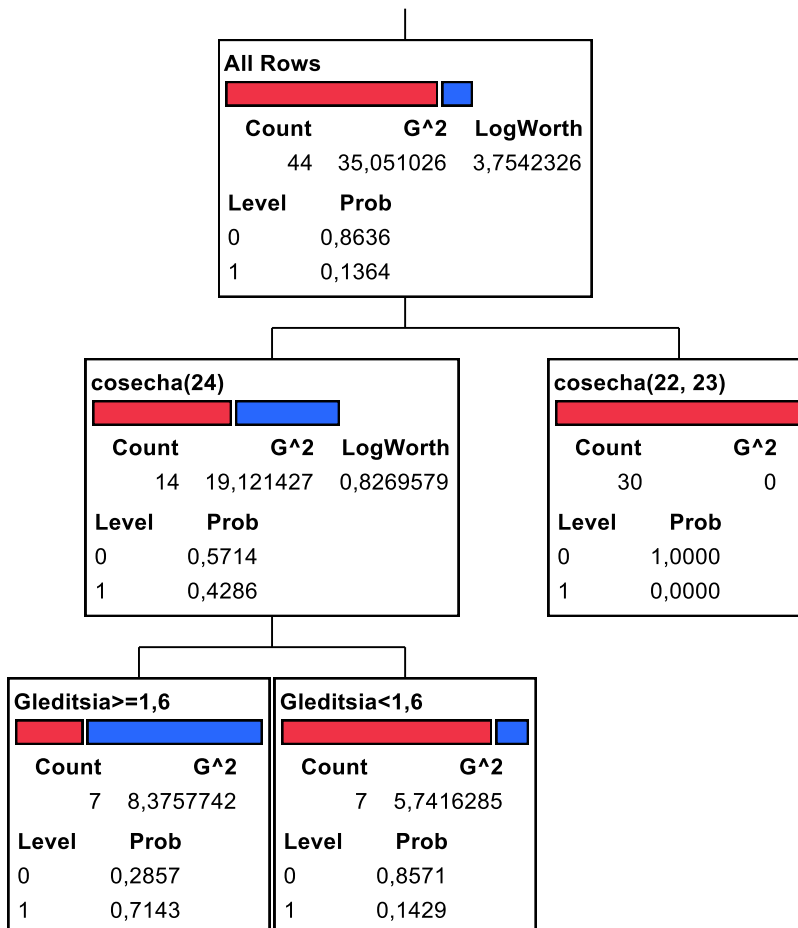
RSquare	N	Number of Splits
0,520	44	2



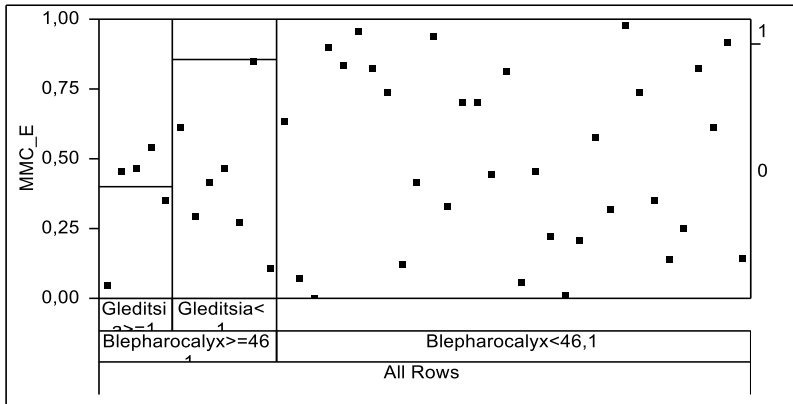
# Partition for MC\_S



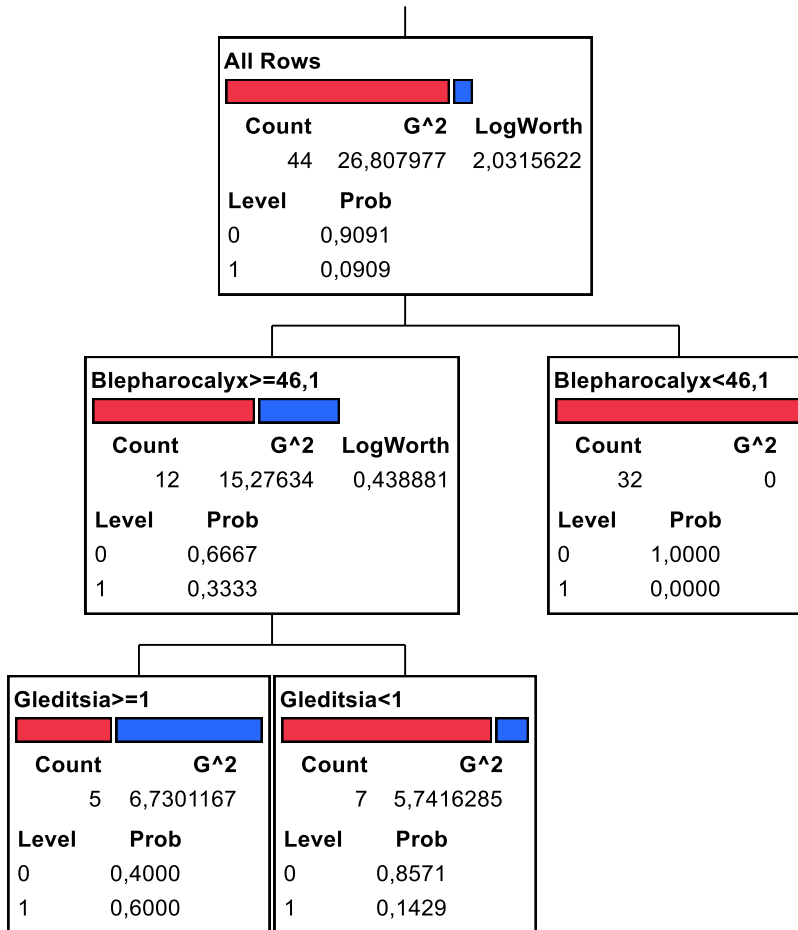
**RSquare**      **N**      **Number of Splits**  
 0,597          44          2



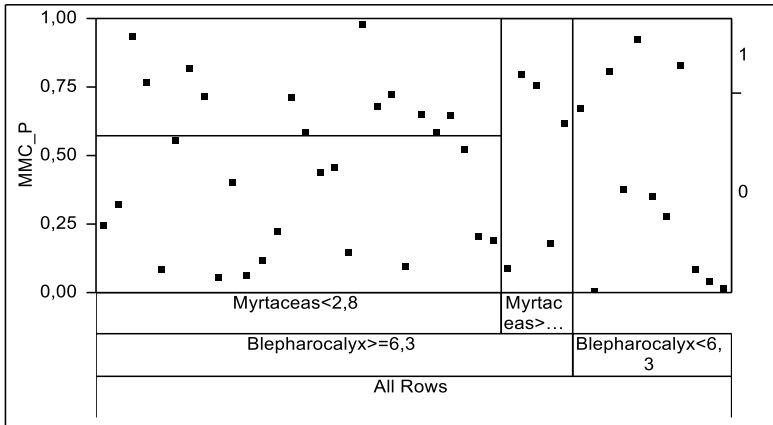
# Partition for MC\_E



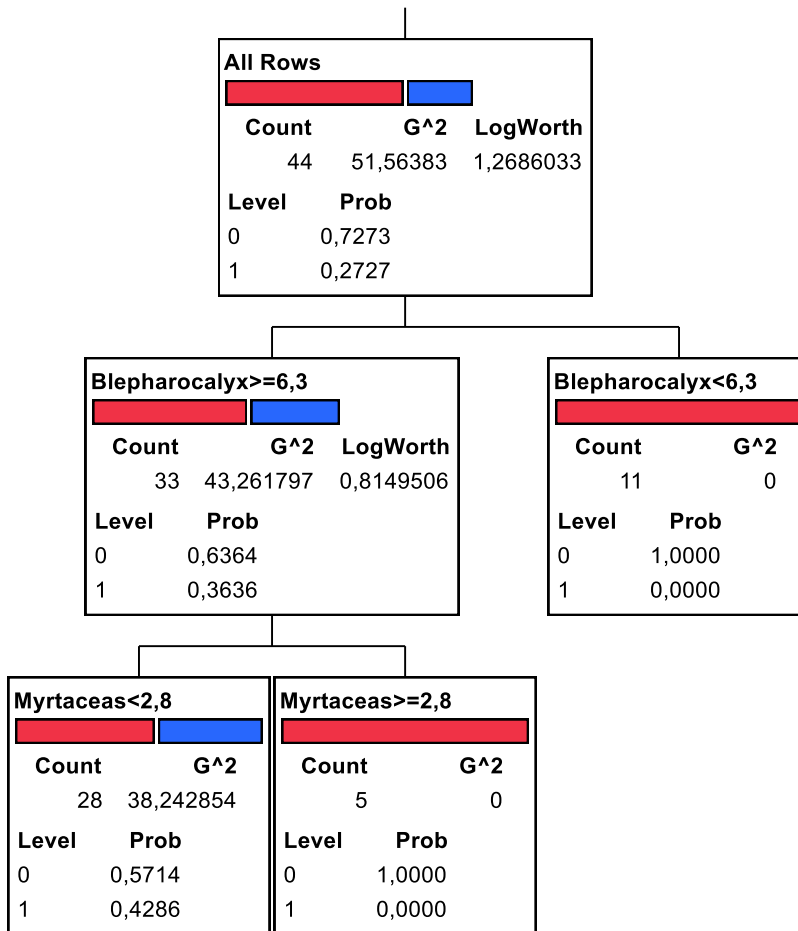
RSquare	N	Number of Splits
0,535	44	2



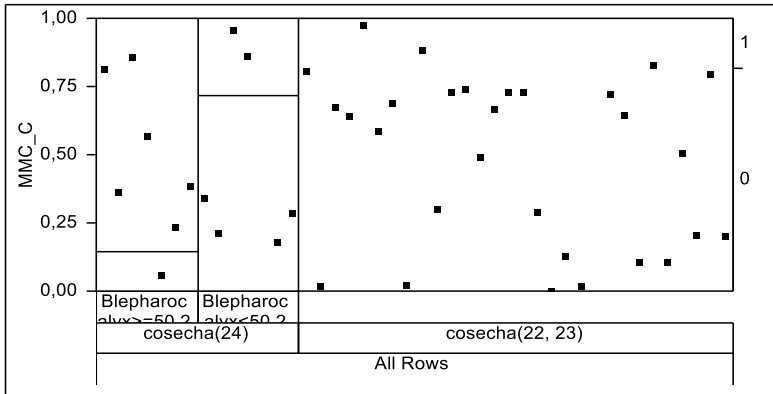
# Partition for MC\_P



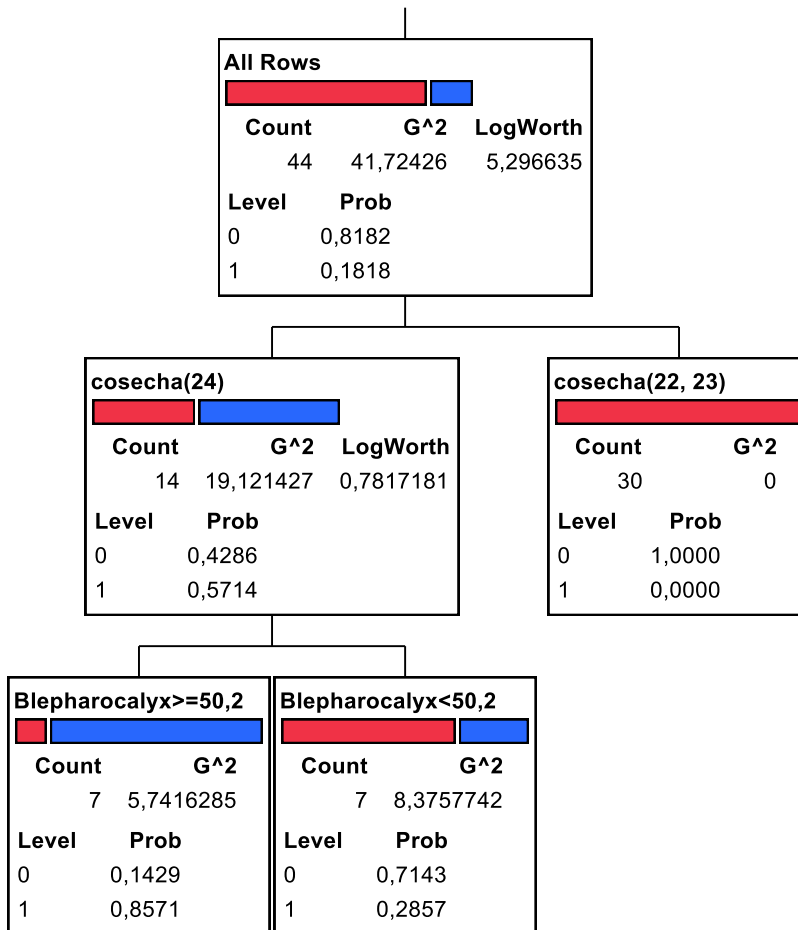
RSquare	N	Number of Splits
0,258	44	2



# Partition for MC\_C



RSquare	N	Number of Splits
0,662	44	2



### 8.3. Resultados completos del mapa de calor

Matriz de correlaciones de Pearson

```
> res$r      # matriz de correlaciones
      IC_P      MC_P      IC_S      MC_S      InBiof_P      InBiof_S
IC_P    1.0000000  0.6324553  0.53935989  0.05976143  0.06332842  0.29162379
MC_P    0.6324553  1.0000000  0.37310125  0.23622780  0.16952987  0.35614950
IC_S    0.53935989  0.37310125  1.00000000  0.41298427 -0.08234231  0.57959417
MC_S    0.05976143  0.23622780  0.41298427  1.00000000  0.11315776  0.46198153
InBiof_P 0.06332842  0.16952987 -0.08234231  0.11315776  1.00000000  0.07685391
InBiof_S 0.29162379  0.35614950  0.57959417  0.46198153  0.07685391  1.00000000
H2O2    -0.41746297 -0.43008630 -0.48863785 -0.21752430  0.15441378 -0.52337541
Acidez  -0.15104930 -0.07008136 -0.05209829 -0.02309010 -0.13914275  0.21184045
pH      -0.20777014 -0.01263513 -0.27938753  0.08459689  0.69499182 -0.36770381
Fenoles 0.40574405  0.11551928  0.18393182 -0.21600517 -0.50855005  0.20312995
      H2O2      Acidez      pH      Fenoles
IC_P    -0.4174630 -0.15104930 -0.20777014  0.4057441
MC_P    -0.4300863 -0.07008136 -0.01263513  0.1155193
IC_S    -0.4886378 -0.05209829 -0.27938753  0.1839318
MC_S    -0.2175243 -0.02309010  0.08459689 -0.2160052
InBiof_P 0.1544138 -0.13914275  0.69499182 -0.5085501
InBiof_S -0.5233754  0.21184045 -0.36770381  0.2031299
H2O2    1.0000000 -0.43620503  0.49438679 -0.6175588
Acidez  -0.4362050  1.00000000 -0.46737750  0.5259769
pH      0.4943868 -0.46737750  1.00000000 -0.8010517
Fenoles -0.6175588  0.52597693 -0.80105167  1.0000000
```

Matriz de p-valores






```
> res$P      # matriz de p-valores
      IC_P      MC_P      IC_S      MC_S      InBiof_P      InBiof_S
IC_P          NA 0.0001769892 0.0020997913 0.75374989 7.395425e-01 0.1179054111
MC_P    0.0001769892          NA 0.0422834681 0.20883603 3.704638e-01 0.0533966257
IC_S    0.0020997913 0.0422834681          NA 0.02331615 6.653204e-01 0.0007892224
MC_S    0.7537498925 0.2088360346 0.0233161492          NA 5.515947e-01 0.0101669755
InBiof_P 0.7395425454 0.3704637731 0.6653204277 0.55159474          NA 0.6864646245
InBiof_S 0.1179054111 0.0533966257 0.0007892224 0.01016698 6.864646e-01          NA
H2O2    0.0217149939 0.0176818686 0.0061467602 0.24821506 4.152297e-01 0.0029984726
Acidez  0.4255882259 0.7128777216 0.7845345717 0.90360256 4.633685e-01 0.2610943664
pH      0.2705810822 0.9471650040 0.1348614199 0.65670586 2.026902e-05 0.0456002693
Fenoles 0.0261084786 0.5432668407 0.3305716078 0.25161542 4.110480e-03 0.2816650213
      H2O2      Acidez      pH      Fenoles
IC_P    0.0217149939 0.425588226 2.705811e-01 2.610848e-02
```

MC_P	0.0176818686	0.712877722	9.471650e-01	5.432668e-01
IC_S	0.0061467602	0.784534572	1.348614e-01	3.305716e-01
MC_S	0.2482150596	0.903602562	6.567059e-01	2.516154e-01
InBiof_P	0.4152296970	0.463368530	2.026902e-05	4.110480e-03
InBiof_S	0.0029984726	0.261094366	4.560027e-02	2.816650e-01
H2O2		NA 0.015962750	5.485821e-03	2.771296e-04
Acidez	0.0159627498		NA 9.211006e-03	2.832865e-03
pH	0.0054858210	0.009211006		NA 1.053886e-07
Fenoles	0.0002771296	0.002832865	1.053886e-07	
	NA			


## 8.4. Publicación derivada de esta tesis

## Congreso Iberoamericano de Ingeniería de los Alimentos

# Exploring the antimicrobial potential of honey from Montes del Queguay

Mattos, N. <sup>1,2</sup>; Cora, S. <sup>1</sup>; Zapata, S. <sup>1</sup>; Tamaño, G. <sup>1</sup>; Alborés, S. <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Tecnológica, Instituto Regional Tecnológico Regional Suroeste, Laboratorio de Tecnología de la Miel y Productos Apícolas, Paysandú, Uruguay


<sup>2</sup>Universidad de la República, Facultad de Química, Área de Microbiología, Montevideo, Uruguay 

### Abstract

In Uruguay, most of the honey produced is destined for bulk export and lacks differentiation. This lack of appreciation for the specific characteristics of locally produced honey results in lower prices compared to other countries. Therefore, research is crucial to identify honeys with distinctive attributes in our country. In the Montes del Queguay region (Paysandú, Uruguay) numerous beekeepers strive to produce pure forest honey with unique properties, taking advantage of the area's unique conditions and natural environment. This work focuses on investigating the antimicrobial potential of honey from Montes del Queguay as well as the possible relationship between antimicrobial activity and the various components and characteristics of the honey, such as free acidity, pH, color, hydrogen peroxide production, phenolic compounds, among others. Samples collected during 2022 and 2023 were analyzed through melissopalynology to determine their floral origin, physicochemical parameters were studied, and total phenolic content was quantified. These results were compared using multivariate analysis. Antimicrobial activity was assessed, determining the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15422, and *Candida albicans* ATCC 101231. The results highlight honeys from native species such as *Scutia buxifolia*, *Blepharocalyx salicifolius*, and *Terminalia australis*, which exhibited high total phenolic concentrations, exceeding 840 mg gallic acid/kg, and demonstrated bacteriostatic activity in all evaluations and bactericidal activity against at least two strains. These results are promising for contributing to the valuation of native flora honeys produced in Uruguay through the characterization of their chemical composition and antimicrobial potential.

**Keywords:** honeys, native flora, antimicrobial potential

### Editor

Ignacio Vieitez   
Universidad de la República,  
Montevideo, Uruguay

Received 24 Oct 2024  
Accepted 13 Dec 2024  
Published 24 Apr 2024

### Correspondence

Natalia Mattos  
natalia.mattos@utec.edu.uy

Silvana Alborés  
salbores@fq.edu.uy



## Explorando el potencial antimicrobiano de las mieles de Montes del Queguay

### Resumen

En Uruguay, gran parte de la miel se exporta a granel sin diferenciarse, lo que genera precios más bajos en comparación con otros países. Por consiguiente, es importante la investigación para identificar mieles con atributos distintivos. En la región de Montes del Queguay (Paysandú, Uruguay) numerosos apicultores se esfuerzan por producir miel pura de monte con propiedades singulares, aprovechando las condiciones y el entorno natural únicos de la zona. Este trabajo investigó el potencial antimicrobiano de las mieles provenientes de Montes del Queguay y su posible relación con componentes como acidez libre, pH, color, producción de peróxido de hidrógeno, compuestos fenólicos, entre otros. Se recolectaron muestras durante los años 2022 y 2023 que fueron analizadas mediante melisopalinología para determinar su origen floral, se estudiaron parámetros fisicoquímicos y se cuantificó el contenido de fenoles totales. Estos resultados se compararon mediante análisis multivariado. La evaluación de actividad antimicrobiana se realizó determinando la concentración mínima inhibitoria y la concentración microbicida mínima frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15422 y *Candida albicans* ATCC 101231. Los resultados obtenidos destacan mieles de especies nativas como *Scutia buxifolia*, *Blepharocalyx salicifolius* y *Terminalia australis*, que exhibieron una concentración alta de fenoles totales, superiores a 840 mg ác. gálico/Kg, y demostraron actividad bacteriostática en todas las evaluaciones y actividad bactericida frente a al menos dos cepas. Estos resultados son promisorios para contribuir a valorizar las mieles de flora nativa producidas en Uruguay a través de la caracterización de su composición química y su actividad antimicrobiana.

**Palabras clave:** mieles, flora nativa, potencial antimicrobiano

## Explorando o potencial antimicrobiano dos méis Montes del Queguay

### Resumo

No Uruguai, grande parte do mel é exportado a granel sem diferenciação, o que resulta em preços mais baixos em comparação com outros países. Por isso, é importante a pesquisa para identificar meles com atributos distintivos. Na região de Montes del Queguay (Paysandú, Uruguai), diversos apicultores se esforçam para produzir mel puro de monte com propriedades singulares, aproveitando as condições e o ambiente natural únicos da região. Este trabalho investigou o potencial antimicrobiano dos meles provenientes de Montes del Queguay e sua possível relação com componentes como acidez livre, pH, cor, produção de peróxido de hidrogênio, compostos fenólicos. Amostras foram coletadas entre os anos de 2022 e 2023, analisadas por meio de melisopalinologia para determinar sua origem floral, estudaram-se parâmetros físico-químicos e quantificou-se o conteúdo de fenóis totais. Os resultados foram comparados por meio de análise multivariada. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada determinando a concentração mínima inibitória e a concentração microbicida mínima frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15422 e *Candida albicans* ATCC 101231. Os resultados destacaram meles de espécies nativas como *Scutia buxifolia*, *Blepharocalyx salicifolius* e *Terminalia australis*, que apresentaram alta concentração de fenóis totais, superiores a 840 mg de ácido gálico/Kg, e demonstraram atividade bacteriostática em todas as avaliações e atividade bactericida contra pelo menos duas cepas. Esses resultados são promissores para contribuir na valorização dos meles de flora nativa produzidos no Uruguai, por meio da caracterização de sua composição química e atividade antimicrobiana.

**Palavras-chave:** méis, flora nativa, potencial antimicrobiano

## 1. Introduction

Honey is defined as the food product produced by honeybees from the nectar of flowers or from secretions from living parts of plants or excretions from plant-sucking insects left on living parts of plants, which bees collect, transform, combine with specific substances of their own, and store and mature in the honeycomb cells of the hive<sup>(1)</sup>. It is a complex food with over 200 reported substances, including sugars, water, proteins, vitamins,

minerals, phenolic compounds, and plant derivatives. Historically, honey has been recognized for its beneficial effects on human health, particularly in wound and burn healing<sup>(2)</sup>.

Antimicrobial resistance is an escalating public health concern. Certain bacteria, such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, are responsible for a significant number of infections, leading to higher rates of morbidity and mortality. The widespread presence of these microorganisms, coupled with factors such as the overuse and misuse of antibiotics, has accelerated the development of antimicrobial resistance in these pathogens<sup>(3)</sup>. According to WHO reports, three of the top ten global causes of death are infectious diseases, responsible for approximately 6 million deaths annually<sup>(4)</sup>. Several initiatives, such as the ESKAPE program, aim to address this issue by encouraging the development of new treatments. The ESKAPE pathogens –*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and various *Enterobacter* species– are currently among the leading causes of hospital-acquired infections in the United States, known for their ability to "escape" the effects of antimicrobial drugs<sup>(5)</sup>. Furthermore, recent research indicates that around one-third of antimicrobials in development may not be sufficient to counteract the rapid emergence of resistance, with very few new drugs offering novel mechanisms of action. Fungal infections are also a significant public health issue. At any given time, a quarter of the global population is estimated to be affected by skin fungal infections. *Candida albicans*, a major fungal pathogen in humans, particularly affects immunocompromised individuals<sup>(6)</sup>. Currently, there are only four main classes of antifungal drugs in use –azoles, echinocandins, pyrimidines, and polyenes–, with few new options under development. Due to the shared eukaryotic nature of both fungal and human cells, antifungal treatments often have significant side effects. To minimize harm to human cells, these medications are designed to target features unique to fungal cells, such as ergosterol in the fungal cell membrane and glucan in the cell wall. Its biofilms exhibit resistance to conventional antifungal treatments as well as the host's immune defenses, making it a pressing health concern<sup>(7)</sup>.

In this context, the increasing resistance of bacteria to antibiotics has driven the exploration of alternative treatments, with honey emerging as a notable option due to its antimicrobial properties and healing potential<sup>(8)(9)(10)</sup>. Honey offers several advantages over antibiotics: it is natural, has no adverse effects, and is cost-effective<sup>(11)</sup>. Recent studies have shown honey's significant effectiveness in reducing the growth of multidrug-resistant bacteria, such as *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, and *Listeria monocytogenes*<sup>(12)(13)(14)(15)</sup>. Furthermore, research has also addressed honey's efficacy against fungi such as *Aspergillus* and *Penicillium*, and yeasts of the genus *Candida* that affect human health<sup>(16)</sup>.

The antimicrobial activity of honey is attributed to a range of compounds that work synergistically, including its high sugar content, osmolarity, pH, hydrogen peroxide production, phenolic compounds, and others such as methylglyoxal<sup>(2)(9)(17)</sup>. Among these, the concentration and type of phenolic compounds and hydrogen peroxide production are primary contributors to its antimicrobial activity<sup>(18)(19)</sup>. Additionally, volatile compounds such as terpenes, monoterpenes, and monoterpenoids (e.g., linalool, citronellal, and isoborneol) present in honey also can exhibit antimicrobial activity against viruses, bacteria, and fungi<sup>(16)</sup>.

However, honey's composition is influenced by its botanical and geographical origin. Therefore, the content of phenols, hydrogen peroxide, and volatile compounds can vary among different honeys, potentially affecting their antimicrobial activity. Identifying the floral origin of honeys is crucial for understanding these variations. Melissopalynology, or pollen analysis, is the standard method used to determine the floral origin of honey. Honeybees selectively use floral resources, incorporating a mixture of nectar and pollen into their honey stomach, and these pollen grains can be identified in the honey. Characterizing honeys based on their botanical and geographical origin enhances market competitiveness<sup>(20)(21)</sup>.

Uruguay ranks among the top 20 global honey exporters, producing 13 thousand tons in 2022, with 80% destined for international markets. In this context, the beekeeping industry primarily focuses on the international market. However, the sector faces significant challenges concerning the reputation of its product quality, resulting in a considerable price gap compared to major global producers. For example, New Zealand, with approximately 11 thousand tons of production, markets its Manuka honey at USD 17.79 per kilogram, while Uruguay sells its bulk honeys –without origin differentiation– at USD 3.57 per kilogram. Quality analyses for export are currently limited to basic routines, focusing on bromatological suitability and pesticide content, which determine whether a batch is accepted or rejected<sup>(22)(23)</sup>.

This study aims to investigate the antimicrobial potential of honeys produced in Montes del Queguay, Paysandú, Uruguay. The interest in this protected area stems from its environmental diversity, which includes a vast and diverse native flora suitable for producing pure honey from native plants such as *Salix humboldtiana* (Creole Willow), *Pouteria salicifolia* (Mataojo), *Erythrina crista-galli* (Ceibo), *Blepharocalyx salicifolius* (Arrayán), and *Myrcianthes cisplatensis* (Red Guava), among others<sup>(24)</sup>. As many beekeepers in the region have relocated their hives to Montes del Queguay in pursuit of high-quality, pure honey, it is essential to intensify research to adequately characterize and value this product.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Honey samples

The study was conducted using raw honey samples collected directly from the apiaries in the area of Montes del Queguay (between the coordinates 32°07'36.6"S, 57°52'56.1"W and 32°12'50.8"S, 57°37'09.6"W). A total of 30 samples were obtained during the spring and autumn seasons of 2022 and 2023. The samples were stored in airtight jars at room temperature and in dark conditions until analysis.

### 2.2 Melissopalynological analysis

Following the methodology established by Louveaux<sup>(25)</sup>, melissopalynological analyses were performed. The honey was dissolved in water to release the pollen grains. The solution was then centrifuged, and the sediment underwent acetolysis using acetic anhydride and sulfuric acid to remove organic material, making the exine – the outermost layer of the pollen– visible. After further centrifugation and washing, the sediment was resuspended in a gelatin-glycerin medium for mounting on slides. Observations were made under a microscope at 40× magnification, with 100× magnification used in specific cases. Pollen counting continued until 700 to 1,200 grains per sample were identified or until the species appearance curve stabilized.

### 2.3 Physicochemical analysis

The physicochemical parameters of honey were assessed, including pH, moisture content, hydroxymethylfurfural (HMF), acidity, and electrical conductivity, following standardized methods outlined by the International Honey Commission<sup>(26)</sup> using a Hanna HI 5521 (Hanna Instruments, USA). Color was measured with a HANNA Honey Colorimeter (Hanna HI 96785, Hanna Instruments, USA) following the standards established by the United States Department of Agriculture (USDA)<sup>(27)</sup>.

### 2.4 Total phenolic content (TPC)

The total phenolic concentration was determined using the Folin-Ciocalteu Spectrophotometric method with modifications<sup>(28)(29)</sup>. Briefly, from a 100 mg/mL honey solution, 0.5 mL was mixed with 2.5 mL of 0.2 N Folin-Ciocalteu reagent. After incubating in the dark for 5 minutes, 2 mL of a 7.5% w/v sodium carbonate solution was

added and the mixture was incubated in darkness for 2 hours. Absorbance was measured at 760 nm using a Genesys 150 spectrophotometer (Thermo Scientific), and the results were expressed as mg of gallic acid per Kg of honey.

## 2.5 Antimicrobial activity

The honey samples were evaluated against the following microorganisms: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15422), and *Candida albicans* (ATCC 101231). Microorganism suspensions (bacteria:  $1 \times 10^8$  CFU/mL, yeast:  $1 \times 10^6$  CFU/mL) were prepared in sterile physiological serum. The initial solutions of the honey, 80% (w/v), were prepared in sterilized water.

### 2.5.1 Minimum Inhibitory Concentration

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against bacteria and fungi were determined by standardized methods, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute<sup>(30)(31)</sup>. MIC of the honey was determined by the broth microdilution method in a 96-well plate (300  $\mu$ L capacity, sterilized, MicroWell, NUNC, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA). Control wells containing sterile medium (sterility control) and medium with microbial suspension (growth control) were included. The MIC was determined as the lowest concentration of honey that inhibited the visible microbial growth after 24 h of incubation.

### 2.5.2 Minimum Microbicidal Concentration

The broths used for MIC determination were subcultured onto nutrient agar plates (Nutrient Agar (OXOID) for bacteria and Potato Dextrose Agar (OXOID) for yeasts). After incubation, the number of viable cells was estimated by determining the number of colony-forming units (cfu). Based on this, the Minimum Microbicidal Concentration (MMC) was determined as the concentration of antimicrobial agent that causes the death of 99.9% of the initial inoculum, as previously reported by Estevez and others<sup>(32)</sup>.

## 2.6 Statistical analysis

Physicochemical analyses and total phenolic content were performed in triplicate, with results expressed as mean and standard deviation. The homogeneity of variances for phenolic content was assessed using Levene's test, followed by one-way ANOVA, and Tukey's post hoc test was employed for pairwise comparisons of means ( $p < 0.05$ ). Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) were performed using RStudio statistical software, version R-4.4.0, to explore relationships between samples.

## 3. Results

### 3.1 Honey samples

A total of 30 honey samples were collected, 16 from the 2022 harvest and 14 from the 2023 harvest. These were obtained from seven different georeferenced regions within Montes del Queguay in the department of Paysandú (Figure 1).

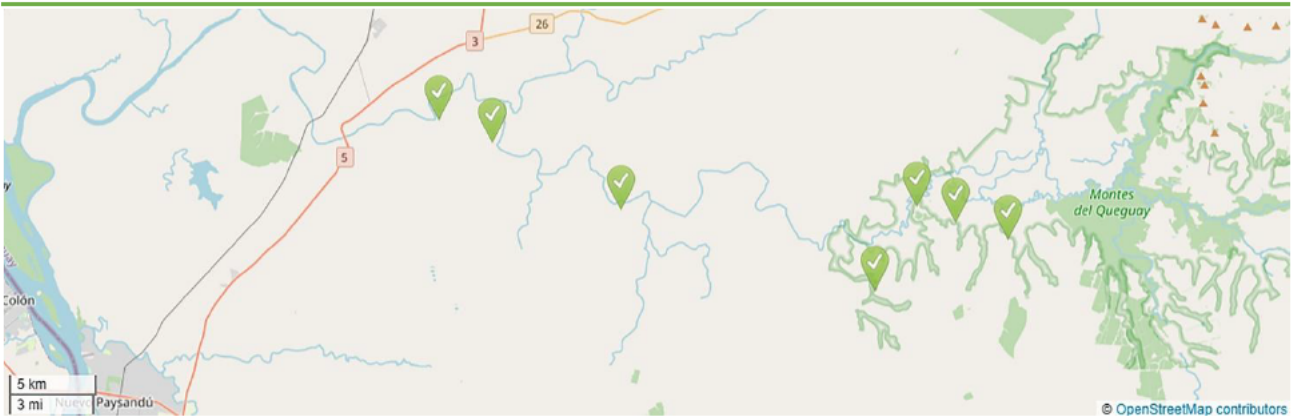


Figure 1. Location of seven apiaries in the region of Montes del Queguay, Paysandú

### 3.2 Melissopalynological analysis

The two-year sampling conducted in the region yielded a significant representation of the floral characteristics of the area. Figure 2 and Figure 3 present the results, illustrating the accumulated pollen content for each sample.

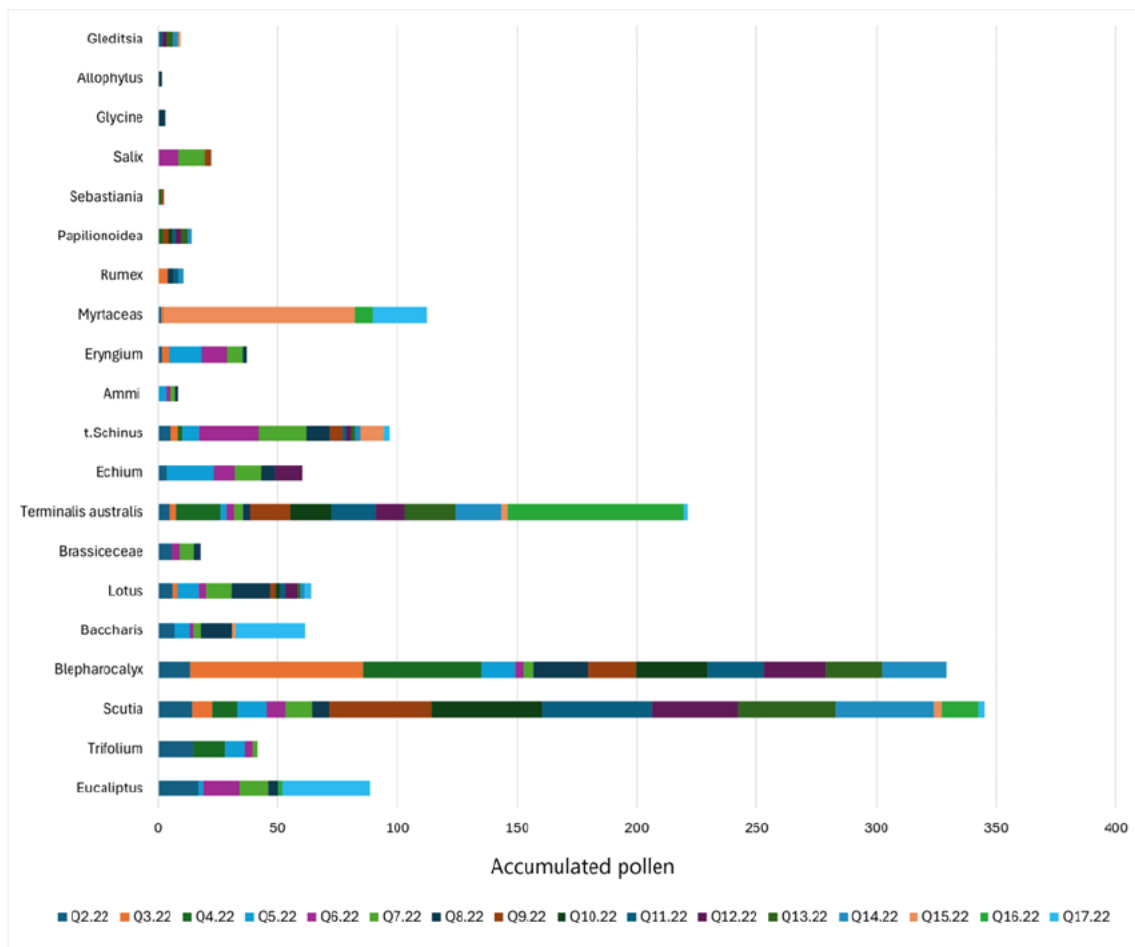
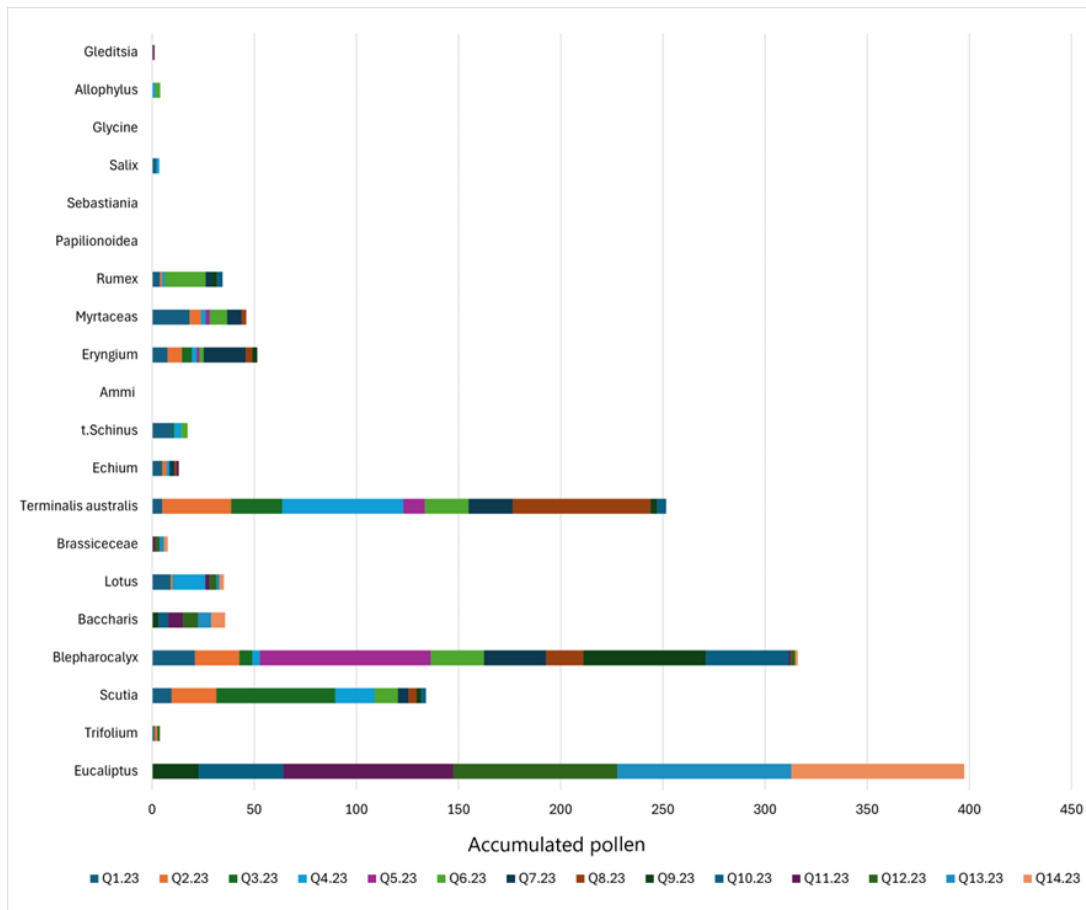


Figure 2. Accumulated pollen content from 2022 harvest samples

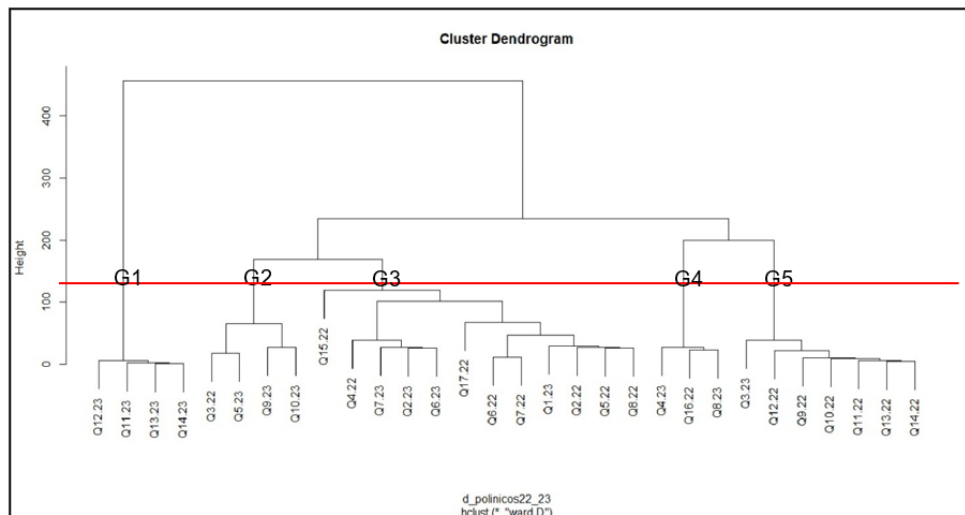
“Q-number” indicates the sample name followed by the harvest year (.22 for 2022).



**Figure 3.** Accumulated pollen content from 2023 harvest samples

“Q-number” indicates the sample name followed by the harvest year (.23 for 2023).

Using hierarchical cluster analysis with Euclidean distances, the dendrogram was analyzed, and five groups were identified based on the chosen cut-off point: G1 (*Eucalyptus* sp.), G2 (*Blepharocalyx salicifolius*), G3 (Multifloral), G4 (*Terminalis australis*), and G5 (*Scutia buxifolia*) (Figure 4).



**Figure 4.** Dendrogram of the samples (Q2:17.22 from 2022 and Q1:14.23 from 2023) grouped according to their dominant pollen content by the Ward method

### 3.3 Physicochemical analysis

The results of the physicochemical analysis are presented in **Table 1**. Free acidity values ranged from 14.1 to 43.1 meq/Kg, the hydroxy-methylfurfural (HMF) content varied from 19.07 to 66.14 mg/Kg, and electrical conductivity measured from 693.2 to 1217.7  $\mu$ S/cm. The pH of the honeys ranged from 3.84 and 5.09, and the color was measured between 73.3 and 119.7 mm Pfund, classifying the honeys as Amber on the Pfund Scale.

**Table 1.** Physicochemical parameters of honey samples

Honey group	Samples	EC ( $\mu$ S/cm) $\pm$ SD	Free acidity (meq/Kg) $\pm$ SD	Color (mmPfund) $\pm$ SD	pH $\pm$ SD	Moisture (%) $\pm$ SD	HMF (mg/Kg) $\pm$ SD
G1	Q11.23	892.9 $\pm$ 9.6	26.9 $\pm$ 0.2	92.3 $\pm$ 0.6	4.77 $\pm$ 0.07	19.0 $\pm$ 0.0	35.59 $\pm$ 0.17
G1	Q12.23	858.9 $\pm$ 36.8	28.67 $\pm$ 1.6	87.0 $\pm$ 0.0	4.65 $\pm$ 0.01	18.2 $\pm$ 0.0	34.15 $\pm$ 3.65
G1	Q13.23	893.73 $\pm$ 1.1	27.8 $\pm$ 1.3	88.0 $\pm$ 0.0	4.62 $\pm$ 0.01	18.6 $\pm$ 0.0	38.26 $\pm$ 0.45
G1	Q14.23	890.03 $\pm$ 8.1	26.2 $\pm$ 0.3	86.3 $\pm$ 0.7	4.66 $\pm$ 0.03	18.6 $\pm$ 0.0	37.79 $\pm$ 0.79
G2	Q3.22	743.5 $\pm$ 10.3	27.6 $\pm$ 1.9	96.7 $\pm$ 0.6	4.04 $\pm$ 0.01	16.6 $\pm$ 0.2	33.22 $\pm$ 1.53
G2	Q5.23	1143.0 $\pm$ 1.0	28.6 $\pm$ 0.1	73.3 $\pm$ 0.8	5.03 $\pm$ 0.02	15.8 $\pm$ 0.0	19.61 $\pm$ 0.44
G2	Q9.23	1131 $\pm$ 1.7	42.8 $\pm$ 1.7	90.0 $\pm$ 1.1	4.77 $\pm$ 0.05	18.6 $\pm$ 0.0	22.53 $\pm$ 1.48
G2	Q10.23	1166.7 $\pm$ 3.0	36.5 $\pm$ 1.3	78.3 $\pm$ 2.7	4.86 $\pm$ 0.12	18.6 $\pm$ 0.0	24.38 $\pm$ 1.22
G3	Q2.22	693.2 $\pm$ 8.9	34.4 $\pm$ 0.6	117.3 $\pm$ 1.5	3.84 $\pm$ 0.03	16.6 $\pm$ 0.2	66.14 $\pm$ 0.43
G3	Q4.22	931.6 $\pm$ 4.9	34.6 $\pm$ 0.8	115.3 $\pm$ 1.5	4.25 $\pm$ 0.02	17.0 $\pm$ 0.1	28.72 $\pm$ 0.61
G3	Q5.22	1049.1 $\pm$ 2.7	20.8 $\pm$ 2.3	99.7 $\pm$ 0.6	4.01 $\pm$ 0.03	17.0 $\pm$ 0.1	35.02 $\pm$ 0.78
G3	Q6.22	781.9 $\pm$ 5.3	22.1 $\pm$ 1.2	102.7 $\pm$ 1.5	4.01 $\pm$ 0.03	16.6 $\pm$ 0.2	32.88 $\pm$ 0.78
G3	Q7.22	791.3 $\pm$ 1.4	22.3 $\pm$ 1.1	104.7 $\pm$ 1.5	4.02 $\pm$ 0.02	16.6 $\pm$ 0.0	27.35 $\pm$ 0.59
G3	Q8.22	751.7 $\pm$ 7.0	33.6 $\pm$ 1.8	119.7 $\pm$ 1.1	3.84 $\pm$ 0.02	17.8 $\pm$ 0.2	28.73 $\pm$ 1.35
G3	Q15.22	817.3 $\pm$ 1.8	15.8 $\pm$ 0.4	85.3 $\pm$ 1.1	4.30 $\pm$ 0.05	16.6 $\pm$ 0.1	32.10 $\pm$ 1.03
G3	Q17.22	825.5 $\pm$ 5.4	16.5 $\pm$ 0.5	90.3 $\pm$ 1.5	4.20 $\pm$ 0.06	17.7 $\pm$ 0.1	46.66 $\pm$ 1.21
G3	Q1.23	790.8 $\pm$ 1.0	43.1 $\pm$ 3.7	90.3 $\pm$ 0.6	4.71 $\pm$ 0.05	17.1 $\pm$ 0.2	24.83 $\pm$ 2.83
G3	Q2.23	879.0 $\pm$ 2.2	28.8 $\pm$ 1.7	91.0 $\pm$ 1.1	4.68 $\pm$ 0.00	16.6 $\pm$ 0.0	32.56 $\pm$ 0.94
G3	Q6.23	1127.7 $\pm$ 5.1	31.9 $\pm$ 0.5	83.0 $\pm$ 1.2	5.09 $\pm$ 0.00	15.4 $\pm$ 0.0	35.81 $\pm$ 0.58
G3	Q7.23	1217.7 $\pm$ 9.7	42.5 $\pm$ 0.3	85.0 $\pm$ 2.3	5.08 $\pm$ 0.10	18.6 $\pm$ 0.0	26.72 $\pm$ 2.96
G4	Q16.22	887.9 $\pm$ 6.2	17.3 $\pm$ 1.2	96.7 $\pm$ 2.5	4.40 $\pm$ 0.05	17.5 $\pm$ 0.1	30.27 $\pm$ 2.82
G4	Q4.23	937.1 $\pm$ 0.7	24.4 $\pm$ 0.8	87.7 $\pm$ 1.3	4.76 $\pm$ 0.10	17.2 $\pm$ 0.8	36.83 $\pm$ 1.57
G4	Q8.23	1041.0 $\pm$ 9.5	25.8 $\pm$ 1.6	75.3 $\pm$ 0.8	4.75 $\pm$ 0.03	18.6 $\pm$ 0.0	19.07 $\pm$ 1.57
G5	Q9.22	923.1 $\pm$ 1.6	14.8 $\pm$ 0.9	73.7 $\pm$ 0.6	4.54 $\pm$ 0.10	16.6 $\pm$ 0.1	25.05 $\pm$ 0.46
G5	Q10.22	923.4 $\pm$ 3.9	14.6 $\pm$ 1.2	75.0 $\pm$ 2.0	4.50 $\pm$ 0.01	16.6 $\pm$ 0.1	24.54 $\pm$ 0.75
G5	Q11.22	923.4 $\pm$ 2.1	16.3 $\pm$ 0.6	74.7 $\pm$ 0.6	4.50 $\pm$ 0.02	17.4 $\pm$ 0.1	30.33 $\pm$ 0.30
G5	Q12.22	926.9 $\pm$ 1.7	14.1 $\pm$ 0.9	85.0 $\pm$ 2.0	4.60 $\pm$ 0.04	16.6 $\pm$ 0.1	31.88 $\pm$ 0.52
G5	Q13.22	938.4 $\pm$ 2.1	16.6 $\pm$ 0.4	84.0 $\pm$ 2.7	4.60 $\pm$ 0.06	17.1 $\pm$ 0.1	30.41 $\pm$ 2.25
G5	Q14.22	938.8 $\pm$ 9.1	12.8 $\pm$ 0.9	84.3 $\pm$ 4.0	4.50 $\pm$ 0.01	16.1 $\pm$ 0.2	33.04 $\pm$ 1.49
G5	Q3.23	928.2 $\pm$ 7.8	23.9 $\pm$ 0.8	89.4 $\pm$ 0.6	4.82 $\pm$ 0.00	16.8 $\pm$ 0.0	33.58 $\pm$ 2.09

### 3.4 Total phenolic content

**Table 2** presents the total phenolic content of the samples, with values ranging from 725.19 to 1703.47 mg of gallic acid per kilogram of honey.

**Table 2.** Total phenolic content per sample

Honey group	Sample	TPC (mg GAE/Kg)	Honey group	Sample	TPC (mg GAE/Kg)
G1	Q11.23	780.09 ± 57.46	G3	Q17.22	946.94 ± 37.13
G1	Q12.23	750.38 ± 43.98	G3	Q1.23	969.99 ± 23.87
G1	Q13.23	725.19 ± 12.35	G3	Q2.23	879.53 ± 2.87
G1	Q14.23	733.43 ± 25.01	G3	Q6.23	1012.11 ± 20.90
G2	Q3.22	1131.37 ± 25.64	G3	Q7.23	1073.70 ± 19.19
G2	Q5.23	844.79 ± 22.03	G4	Q16.22	1008.29 ± 23.10
G2	Q9.23	848.34 ± 5.81	G4	Q4.23	849.93 ± 36.57
G2	Q10.23	853.00 ± 17.89	G4	Q8.23	825.18 ± 23.32
G3	Q2.22	1583.21 ± 34.86	G5	Q9.22	1058.39 ± 24.14
G3	Q4.22	1661.20 ± 36.45	G5	Q10.22	1038.15 ± 23.73
G3	Q5.22	1211.28 ± 27.26	G5	Q11.22	1111.90 ± 25.24
G3	Q6.22	1234.07 ± 26.71	G5	Q12.22	1042.81 ± 23.82
G3	Q7.22	943.48 ± 21.81	G5	Q13.22	998.26 ± 22.90
G3	Q8.22	1703.47 ± 37.31	G5	Q14.22	1191.31 ± 26.85
G3	Q15.22	894.66 ± 20.81	G5	Q3.23	863.71 ± 14.79

Additionally, physicochemical parameters –including pH, free acidity, electrical conductivity, and color– were analyzed alongside the total phenolic content (TPC) using Principal Component Analysis (PCA) (**Figure 5** and **Figure 6**). This analysis aimed to assess whether the relationships among these parameters could effectively differentiate the honey samples studied, successfully accounting for 81% of the accumulated variance. A positive relationship was observed between the color parameters and TPC concerning component 1. In contrast, pH and conductivity showed a positive correlation with each other but a negative relationship with component 1. On the other hand, free acidity did not exhibit a significant correlation and appeared as an independent parameter from the others analyzed.

In the PCA sample distribution (**Figure 6**), it can be seen how samples Q2, Q4, and Q8 from 2022 clustered together due to their high TPC and color content. Samples from group G1 (*Eucalyptus* sp.) are more clustered in the lower left quadrant due to their lower TPC content, while Multifloral honeys (G3) are more dispersed due to the diversity in their composition. Additionally, groupings based on the harvest year of the samples are highlighted in red –2023– and blue –2022–.

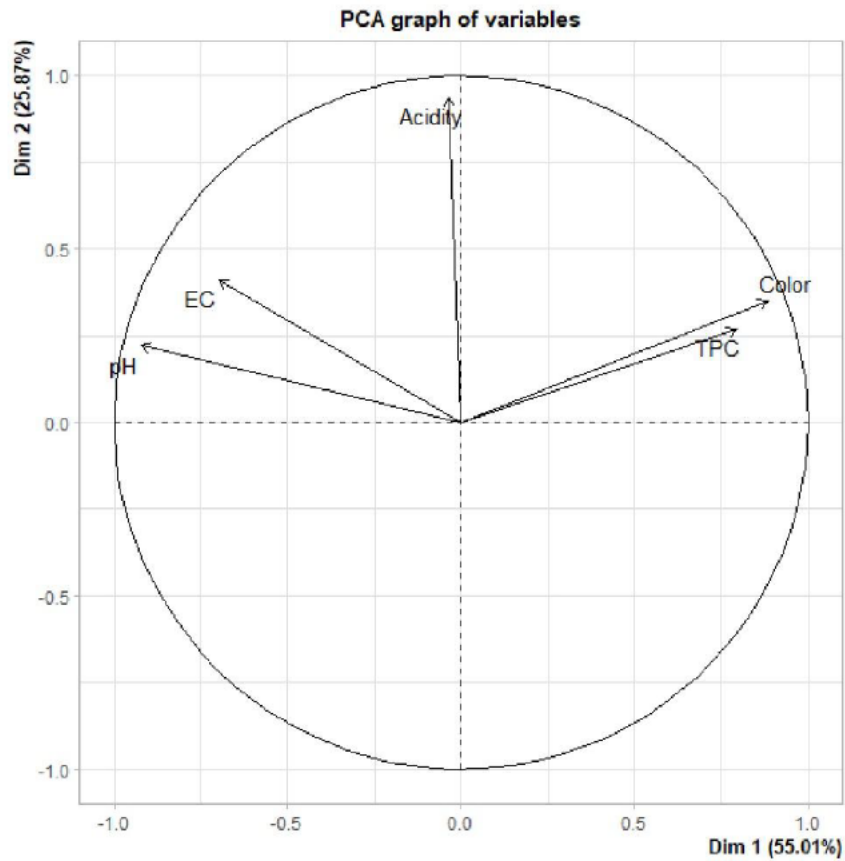


Figure 5. Principal component analysis derives from pH, free acidity, EC, color, and TPC

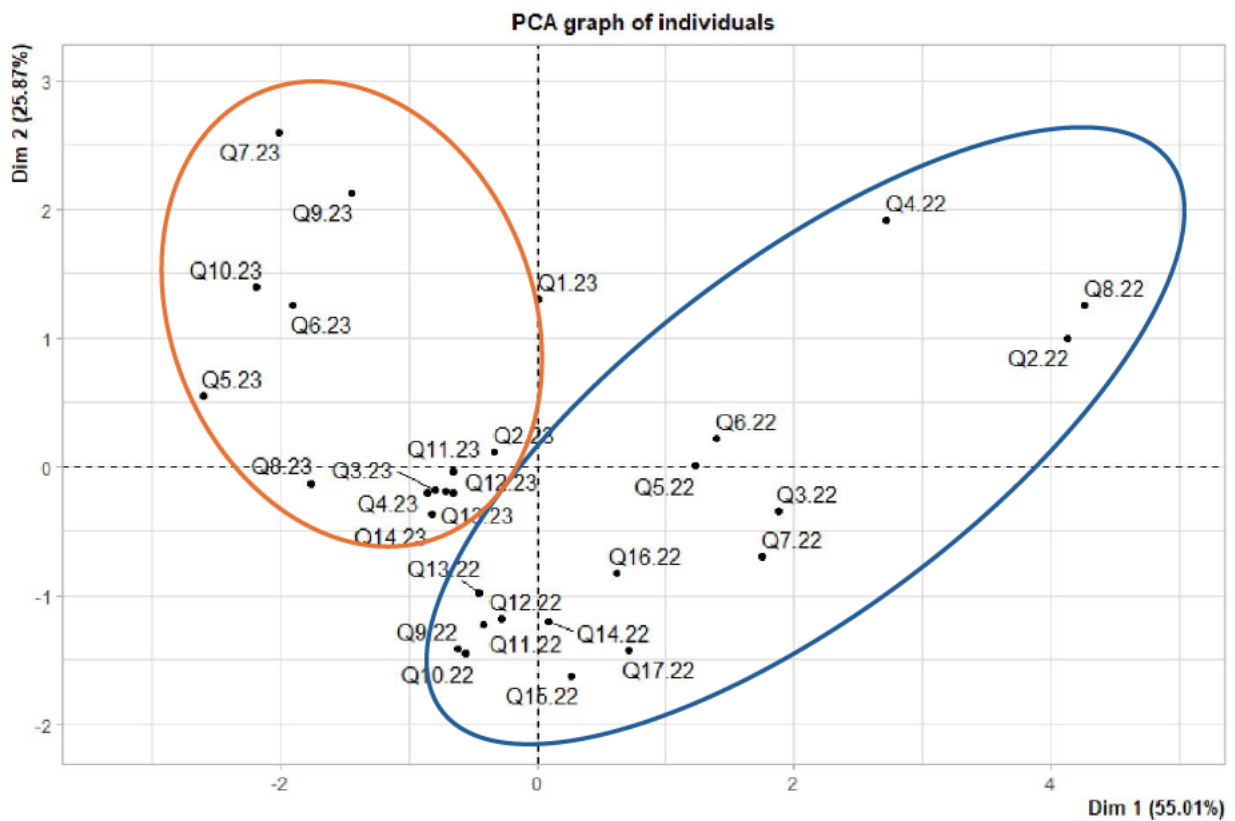


Figure 6. Principal component analysis illustrating honey samples based on the physicochemical studies

### 3.5 Antimicrobial activity

#### 3.5.1 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

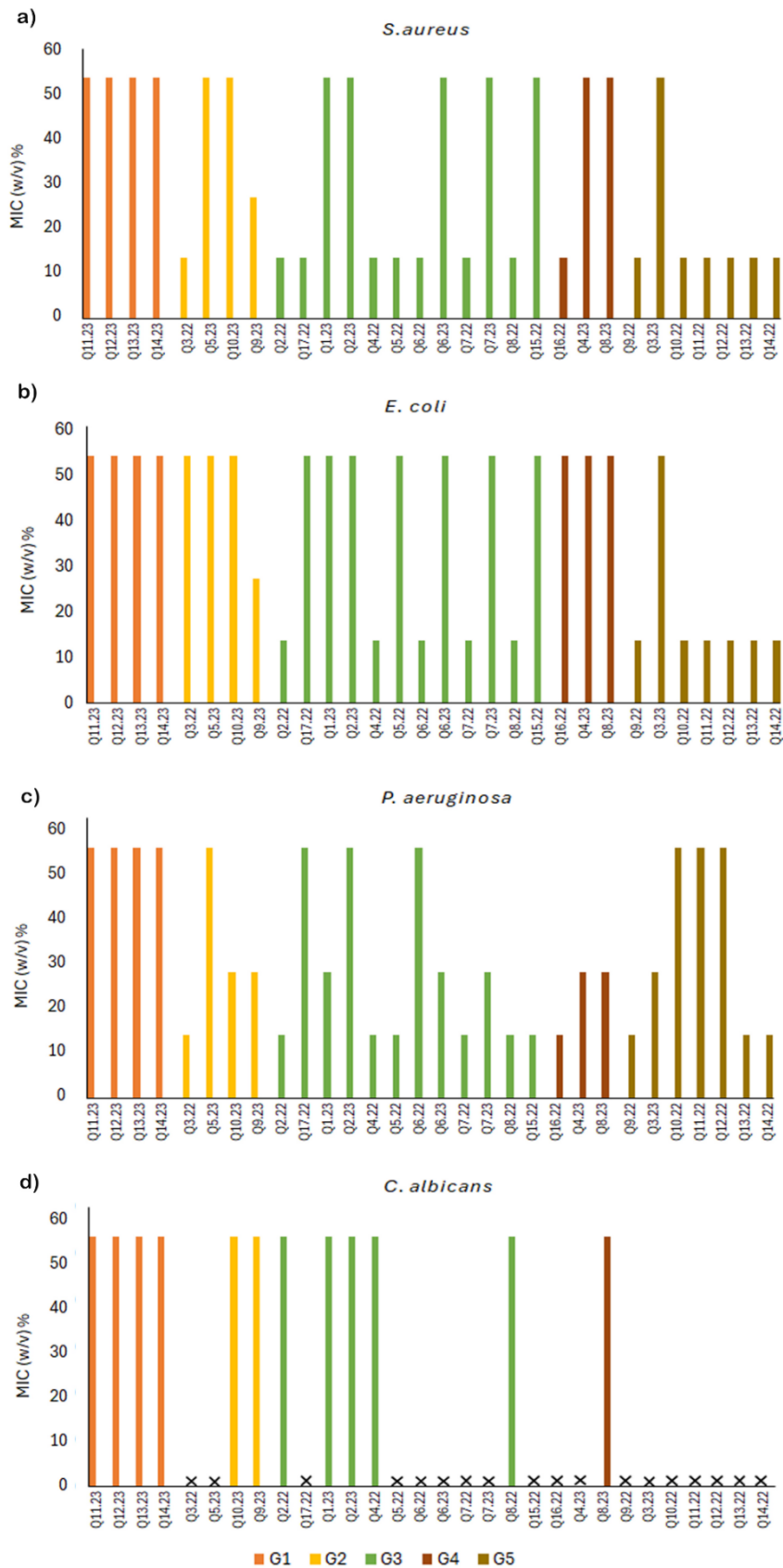
The results of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) tests are presented in **Figure 7**, detailing the antimicrobial activity of the 2022 and 2023 harvest samples. For *S. aureus*, the 2022 samples exhibited a general MIC of 13.3 % (w/v), except for sample Q15.22, which had a MIC of 53.3% (w/v). In 2023, most of the honeys samples displayed a MIC of 53.3% (w/v), except for Q9.23, which recorded a MIC of 26.7% (w/v). For *E. coli*, the 2022 honey samples had MIC values ranging from 13.3 to 53.3% (w/v), with 13.3% (w/v) values for samples Q2.22, Q4.22, Q6.22 - Q14.22, while samples Q3.22, Q5.22, Q15.22, and Q16.22 showed MIC values of 53.3% (w/v). In 2023, all samples had a MIC of 53.3% (w/v), except for Q9.23, which had a value of 26.7%. For *P. aeruginosa*, the MIC values in 2022 were 13.3% (w/v) for samples Q2.22 - Q5.22, Q7.22 - Q9.22, Q13.22 - Q16.22, while the remaining samples exhibited a MIC of 53.3% (w/v). In 2023, MIC values for *P. aeruginosa* ranged from 26.7 to 53.3% (w/v). Regarding *C. albicans*, the 2022 samples primarily showed no inhibitory effects at the evaluated concentrations, with the exception of Q2.22, Q4.22, and Q8.22, which had a MIC of 53.3% (w/v). In 2023, samples were classified into those that exhibited antimicrobial activity (MIC = 53.3%), Q1.23, Q2.23, Q6.23, Q11.23 - Q14.23, and those that demonstrated no inhibition at the evaluated concentrations.

According to the hierarchical cluster analysis, Group 1 (*Eucalyptus sp.*) exhibited high MIC values against all tested microorganisms. In contrast, Group 2 (*B. salicifolius*) displayed more variability, with several samples demonstrating MIC values as low as 26.7% (w/v) against *S. aureus* and *E. coli*. Group 3 (multifloral) also showed moderate antimicrobial activity, particularly against *S. aureus* and *P. aeruginosa*. Group 4 (*T. australis*) demonstrated lower MIC values against *P. aeruginosa* and *S. aureus*, suggesting greater efficacy, while MIC values for *E. coli* and *C. albicans* were predominantly at 53.3%(w/v). Finally, Group 5 (*S. buxifolia*) exhibited minimal antimicrobial activity, with most samples showing MIC values concentrated at 53.3% (w/v) or no inhibition against *P. aeruginosa* and *C. albicans*.

#### 3.5.2 Minimum Microbicidal Concentration (MMC)

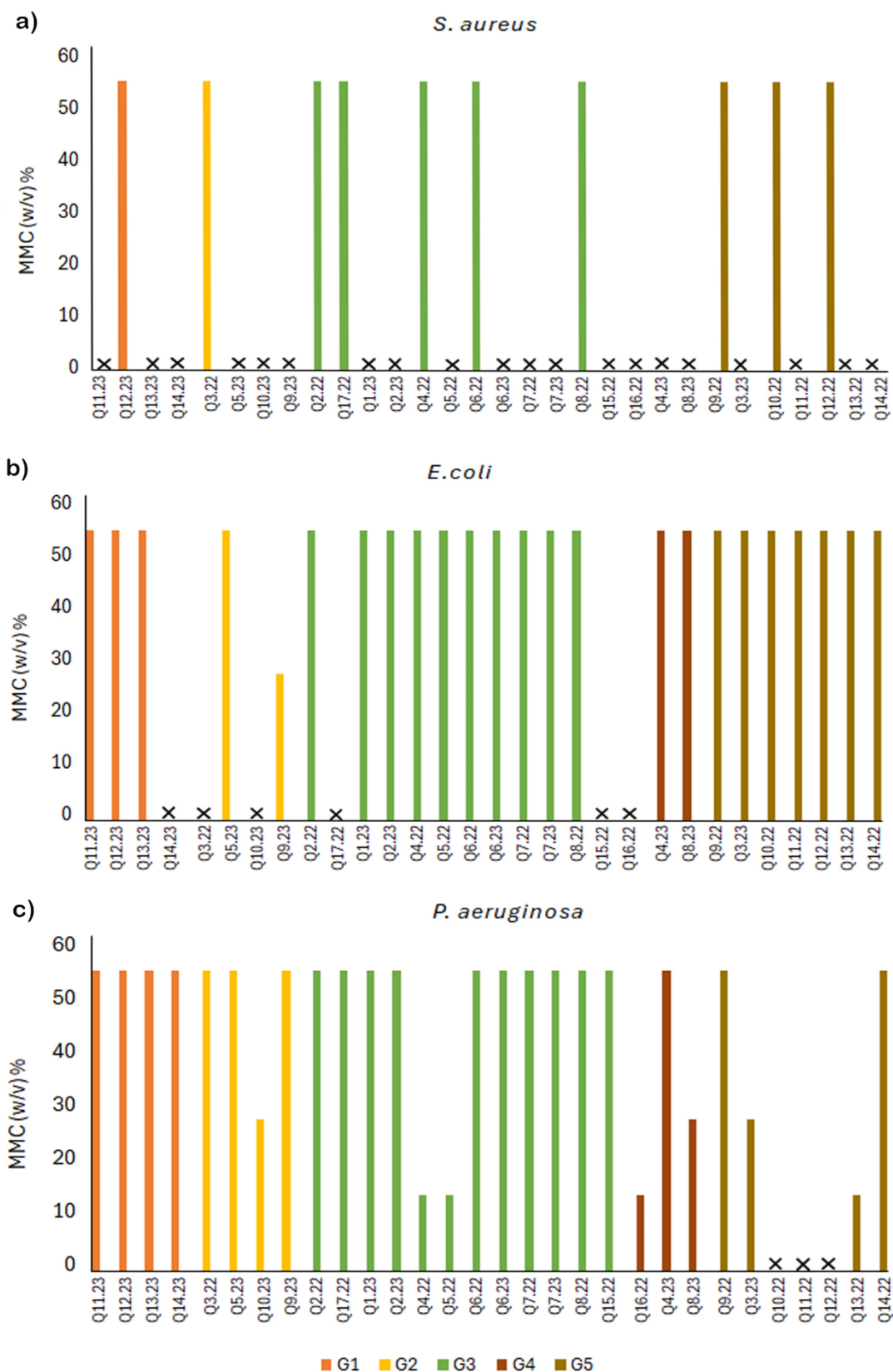
Results of the Minimum Microbicidal Concentration (MMC) for each sample against the evaluated bacteria are shown in **Figure 8**. The 2022 samples demonstrated bactericidal effects against the three bacteria strains, while most 2023 samples did not show bactericidal effects against *S. aureus*, with the exception of Q12.23. For *E. coli*, no significant differences were observed between the harvests, with MMC values of 53.3% for most samples. Exceptions included Q3.22, Q15.22, Q16.22, Q17.22, and Q14.23, which exhibited no bactericidal activity, and sample Q9.23, which showed a lower MMC value of 26.7% (w/v). The sensitivity of *P. aeruginosa* to the 2022 samples was variable, with MMC values ranging from 13.3 to 53.3% (w/v), while the 2023 samples exhibited MMC ranging from 26.7 to 53.3% (w/v). None of the samples demonstrated microbicidal activity against *C. albicans* at the evaluated concentrations.

According to the hierarchical cluster analysis, Group 4 (*T. australis*) did not exhibit microbicidal effect against *S. aureus*, whereas 42% of the samples from the Multifloral group (G3) demonstrated this effect. Some samples from Group 5 (*S. buxifolia*), Group 1 (*E. sp.*) and Group 2 (*B. salicifolius*) also exhibited a microbicidal effect against *S. aureus*. All samples from Group 5 displayed microbicidal activity against *E. coli*, while not all samples in the other groups showed this effect. Regarding *P. aeruginosa*, greater variability was observed in the results: all samples from Group 1 demonstrated high MMC values, while one sample from Group 2 recorded a value of 26.7%. Groups 3, 4, and 5 included some samples with lower MMC values, ranging from 26.7 to 13.3% (w/v), and three samples from Group 5 did not exhibit microbicidal activity against *P. aeruginosa*.



**Figure 7.** Comparison of Minimum Inhibitory Concentration of different honey types

Antimicrobial activity of honeys was determined against a) *S. aureus*, b) *E. coli*, c) *P. aeruginosa*, and d) *C. albicans*, where “X” indicates no inhibitory effect. The colors of the samples correspond to the groups defined by the hierarchical cluster analysis (G1, G2, G3, G4, and G5)



**Figure 8.** Comparison of Minimum Microbicidal Concentration of different honey types

Microbicide activity of honeys was determined against a) *S. aureus*, b) *E. coli*, and c) *P. aeruginosa* where “X” indicates no bactericidal effect. The colors of the samples correspond to the groups defined by the hierarchical cluster analysis (G1, G2, G3, G4, and G5).

## 4. Discussion

The melissopalynological analysis underscored the significance of the region's native flora as a nectar source. Monofloral honeys were identified from native species such as *Scutia buxifolia*, *Blepharocalyx salicifolius*, and *Terminalia australis*, indicating that native plants play a crucial role in the ecosystem and that beekeeping may positively influence biodiversity preservation through pollination.

Approximately 60% of the analyzed samples contained a predominant pollen species, defined as constituting at least 37% of the total pollen identified in the sample. These findings suggest a strong dependence of bees on specific floral resources during the collection period, likely influenced by seasonal abundance or the attractiveness of these species<sup>(33)</sup>. Conversely, the remaining 40% of the samples were classified as multifloral, indicating a more balanced pollen composition without the clear dominance of a single floral species.

Among the groups analyzed, Group 1 was composed of four samples (Q11-Q14.23), and had an average of 84% of *Eucalyptus sp.* pollen, indicating a pronounced dependence of foraging bees on these exotic plantations. The high concentration of *Eucalyptus sp.* pollen suggests that these trees, likely located near the protected area, served as a primary floral resource for the bees during the sampling period. This predominance may be partly attributed to the drought conditions recorded in the region, which prompted the Ministry of Livestock, Agriculture, and Fisheries to declare an agricultural emergency in October 2022, affecting several productive sectors, including beekeeping<sup>(34)</sup>. Under water stress conditions, the flowering of many native species is often reduced or delayed, while eucalyptus species, known for their high tolerance to these adverse conditions<sup>(35)(36)</sup>, continue to bloom and provide nutritional resources. This likely led to an increased reliance of bees on *Eucalyptus sp.* as a food source, highlighting the significant influence of this introduced species on bee foraging dynamics

Group 2, comprising samples Q3.22, Q5.23, Q9.23, and Q10.23, averaged 66% of *B. salicifolius* pollen. This result underscores the importance of this native species in the floral supply of the study area and its relevance as a resource for honeybees. Meanwhile, the multifloral group G3 included 12 samples containing pollen from various species, both native and exotic, with a predominance of *B. salicifolius*, *S. buxifolia*, *Schinus sp.*, and *T. australis*. This reflects the utilization of multiple floral resources, suggesting high floral richness and a preference for a varied diet among foraging. Group 4, consisting of samples Q4.23, Q16.22, and Q8.23, had an average of 67.5% *T. australis* pollen as predominant. This native species, commonly associated with riparian zones, provided a substantial source of floral resources during the fall period<sup>(24)</sup>.

Group 5, comprising seven samples (Q3.23, Q12.22, Q9.22, Q10.22, Q11.22, Q13.22, and Q14.22), contained an average of 44% *S. buxifolia* pollen. The high presence of this species in the honeys analyzed indicates its significance as a food source for bees in the region.

In terms of physicochemical properties, free acidity, moisture content, and hydroxymethylfurfural (HMF) content were evaluated in accordance with the National Food Regulations. Except for the HMF value in sample Q2.22 (HMF > 60 mg/kg), all results were within the established limits<sup>(1)</sup>. However, for electrical conductivity, which is not regulated by these standards, the obtained results exceeded the maximum value assigned for floral honeys by the Codex Alimentarius ( $\leq 800 \mu\text{S}/\text{cm}$ )<sup>(37)</sup>. Most of the honey samples studied exhibited values above this limit, aligning with studies that report conductivities greater than  $1100 \mu\text{S}/\text{cm}$  in chestnut honeys<sup>(38)(39)</sup>. In Uruguay, honeys sourced from natural forests and native flora have also been documented with conductivity values exceeding those established by the Codex Alimentarius<sup>(39)(40)(41)</sup>. Notably, these honeys are not classified as honeydew honeys, as the significant presence of pollen in the samples indicates they are floral honeys. These results suggest a need for further study into the characteristics of Uruguayan soils and their mineral content, which could influence the elevated conductivity values of the honeys relative to their geographic origin.

Concerning TPC, it exhibited significant variation among the honey sample groups analyzed, with values ranging from 725.19 to 1703.47 mg of gallic acid per kilogram of honey. These values are comparable to, or even exceed, those reported by previous studies<sup>(42)(43)(44)</sup>, which also investigated the influence of polyphenol content on the antimicrobial activity of various honeys.

Among the groups analyzed, multifloral honeys (G3) stood out with the highest total phenolic content, significantly surpassing the monofloral *Eucalyptus sp.* honeys (G1). The floral complexity of Group 3 honeys may enhance the diversity of phenolic compounds, thereby improving their bioactive properties, which could lead to greater antioxidant and antimicrobial capacities<sup>(43)</sup>. In contrast, Groups G2 (*B. salicifolius*), G4 (*T. australis*), and G5 (*S. buxifolia*), composed of native flora honeys, exhibited intermediate TPC values that did not significantly differ from one another. This lack of significant differences may be attributed to the high standard deviation, reflecting intragroup variability. Principal Component Analysis (PCA) was performed on the results obtained for the physicochemical parameters (pH, free acidity, electrical conductivity, and color), along with TPC. In the PCA distribution (**Figure 6**), samples Q2, Q4, and Q8 from 2022 clustered together due to their high total phenolic content (TPC) and intense color, which correlated with their antibacterial activity against *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*, as well as their inhibitory activity against *C. albicans*. Samples from Group G1 (*Eucalyptus sp.*) were more tightly clustered in the lower left quadrant, reflecting their lower TPC levels, whereas multifloral honeys (G3) displayed greater dispersion due to their compositional diversity. Additionally, the red and blue clusters represent groupings by harvest year, highlighting physicochemical variability influenced by the climatic conditions of each year. The 2022 samples are associated with higher TPC and more intense coloration, along with lower EC, whereas the 2023 samples show lower TPC and color, but higher EC and pH values.

Regarding antimicrobial activity of the evaluated honey samples, it showed variations across different harvests and floral groupings, underscoring the influence of botanical diversity and annual variability on the MIC and MMC results. These factors appear to significantly impact honey's efficacy in inhibiting and eliminating microorganisms due to fluctuations in their chemical compositions. Overall, most of the 2022 samples exhibited higher antimicrobial activity compared to those from 2023. Moreover, this range of concentrations aligns with the results obtained from honey samples of different botanical origins against the microorganisms evaluated in this study (*S. aureus* and *P. aeruginosa*, as reported by Bucekova and others<sup>(44)</sup>; *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *C. albicans*, as reported by Bazaid and others<sup>(8)</sup>).

Similarly, the analysis of floral groups revealed that multifloral honeys and those from *S. buxifolia* (groups G3 and G5) presented a higher proportion of bactericidal activity against *S. aureus*. Another clinically relevant microorganism, *E. coli*, showed more consistent MIC and MMC results across harvests, with a MIC of 53.3% (w/v) in most samples from both years, indicating moderate efficacy compared to other honeys studied where the MIC range was between 6.25 and 50% (w/v)<sup>(45)</sup>. Additionally, the analysis of floral groups highlighted the bactericidal activity of *S. buxifolia* honeys against *E. coli*, emphasizing the antimicrobial properties of these honeys. MIC results against *P. aeruginosa* were similar to those reported by Bazaid and others<sup>(8)</sup>, Bucekova and others<sup>(44)</sup>, and Faúndez and others<sup>(41)</sup>. MMC values followed a similar pattern, with native species-pollen-rich groups (G2, G3, G4, and G5) presenting samples with lower values of 53.3% (w/v), which could indicate higher microbicidal efficacy from species like *B. salicifolius*, *T. australis*, *S. buxifolia*, and their mixes with other botanical species. Although *Eucalyptus sp.* samples exhibited inhibitory activity, none of them showed microbicidal activity against *C. albicans* under the evaluated conditions. These results align with previous studies indicating that the antifungal properties of honey are often more limited or require higher concentrations to be effective against yeasts<sup>(8)(46)</sup>.

## 5. Conclusions

The melissopalynological and physicochemical analysis of honey samples from Montes del Queguay highlights the crucial role of native flora, such as *Scutia buxifolia*, *Blepharocalyx salicifolius*, and *Terminalia australis*. The prevalence of *Eucalyptus* sp. in some samples further emphasizes the impact of exotic species, particularly under adverse conditions. The elevated electrical conductivity suggests that honey from this region may have distinct properties due to local soil mineral content, warranting further investigation. The statistical analysis revealed a clear differentiation of honey samples by TPC, color, and harvest year, which were linked to their antimicrobial activity. Overall, the antimicrobial efficacy was greater in the 2022 samples, with multifloral honeys and those from *Scutia buxifolia* showing the highest bactericidal activity against *S. aureus* and *E. coli*. However, the antifungal properties against *C. albicans* were limited.

This study underscores the influence of native floral resources on honey composition, as well as the importance of environmental factors in shaping honey's physicochemical and antimicrobial properties. These findings offer valuable insights into the ecological and potential therapeutic applications of regional honeys, highlighting the need for further research into their unique properties.

### Acknowledgements

We gratefully acknowledge the support and guidance provided by BSc. Gloria Daners from the School of Science of the University of the Republic (Udelar). This work was supported by the Directorate of Research and Development of the Technological University (UTEC), Uruguay, and the University of the Republic (Udelar), Uruguay, and the Program for the Development of Basic Sciences (Peduciba).

### Transparency of data

The entire data set that supports the results of this study was published in the article itself.

### Author contribution statement

NM: Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Visualization.

SC: Investigation.

SZ: Investigation, Writing – review & editing.

GT: Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing.

SA: Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing.

## References

- (1) Reglamento Bromatológico Nacional: Decreto N° 315/994 de fecha 05/07/1994 anotado y concordado con apéndice informativo [Internet]. 5a ed. Montevideo: IMPO; 2012 [cited 2025 Jan 02]. 648p. Available from: <https://montevideo.gub.uy/sites/default/files/biblioteca/bromatologico5a.edicion.pdf>
- (2) Nolan VC, Harrison J, Cox JAG. Dissecting the antimicrobial composition of honey. *Antibiotics* (Basel). 2019;8(4):251. Doi: 10.3390/antibiotics8040251.

- (3) Mudenda S, Hikaambo CN, Chabalenge B, Mfuno RL, Mufwambi W, Ngazimbi M, Matafwali S, Daka V. Antibacterial activities of honey against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: a potential treatment for bacterial infections and alternative to antibiotics. *J Pharmacogn Phytochem*. 2023;12(3):6-13. Doi: 10.22271/phyto.2023.v12.i3a.14655.
- (4) WHO. WHO methods and data sources for country-level causes of death 2000-2021 [Internet]. 2024 [cited 2025 Jan 02]. 55p. Available from: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/gho-documents/global-health-estimates/ghe2021\\_cod\\_methods.pdf?sfvrsn=dca346b7\\_1](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/gho-documents/global-health-estimates/ghe2021_cod_methods.pdf?sfvrsn=dca346b7_1)
- (5) Pandey R, Mishra SK, Shrestha A. Characterisation of ESKAPE pathogens with special reference to multidrug resistance and biofilm production in a Nepalese hospital. *Infect Drug Resist*. 2021;14:2201-22. Doi: 10.2147/IDR.S306688.
- (6) WHO fungal priority pathogens list to guide research, development, and public health action [Internet]. Geneva: WHO; 2022 [cited 2025 Jan 02]. 33p. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>
- (7) Raffaelli S, Abreo E, Altier N, Vázquez Á, Alborés S. Bioprospecting the antibiofilm and antimicrobial activity of soil and insect gut bacteria. *Molecules*. 2022;27(6):2002. Doi: 10.3390/molecules27062002.
- (8) Bazaid AS, Aldarhami A, Patel M, Adnan M, Hamdi A, Snoussi M, Qanash H, Imam M, Monjed MK, Khateb AM. The antimicrobial effects of Saudi sumra honey against drug resistant pathogens: phytochemical analysis, antibiofilm, anti-quorum sensing, and antioxidant activities. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022;15(10):1212. Doi: 10.3390/ph15101212.
- (9) Schencke C, Vásquez B, Sandoval C, Del Sol M. El rol de la miel en los procesos morfofisiológicos de reparación de heridas. *Int J Morphol*. 2016;34(1):385-95. Doi: 10.4067/s0717-95022016000100056.
- (10) Escuredo O, Silva LR, Valentão P, Seijo MC, Andrade PB. Assessing *Rubus* honey value: pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity. *Food Chem*. 2012;130(3):671-8. Doi: 10.1016/j.foodchem.2011.07.107.
- (11) Johnston M, McBride M, Dahiya D, Owusu-Apenten R, Nigam PS. Antibacterial activity of Manuka honey and its components: an overview. *AIMS Microbiol*. 2018;4(4):655-64. Doi: 10.3934/microbiol.2018.4.655.
- (12) Stefanis C, Stavropoulou E, Giorgi E, Voidarou CC, Constantinidis TC, Vrioni G, Tsakris A. Honey's antioxidant and antimicrobial properties: a bibliometric study. *Antioxidants (Basel)*. 2023;12(2):414. Doi: 10.3390/antiox12020414.
- (13) Nishio EK, Ribeiro JM, Oliveira AG, Andrade CG, Proni EA, Kobayashi RK, Nakazato G. Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807. *Sci Rep*. 2016;6:21641. Doi: 10.1038/srep21641.
- (14) Márquez J, Vásquez P, Carvajal F, Díaz I, Castillo C. Antimicrobial activity of honeys from *Apis mellifera* L. produced in the Region del Maule, Chile, against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans*. *Cienc Tecnol Aliment*. 2014;10:75-82.
- (15) Montenegro G, Salas F, Peña RC. Actividad antibacteriana y antifúngica de mieles monoflorales de Quillaja saponaria, especie endémica de Chile. *Phyton*. 2009;78:141-6.
- (16) Feknous N, Boumendjel M. Natural bioactive compounds of honey and their antimicrobial activity. *Czech J Food Sci*. 2022;40(3):163-78. Doi: 10.17221/247/2021-cjfs.
- (17) Combarros-Fuertes P, Fresno JM, Estevinho MM, Sousa-Pimenta M, Tornadijo ME, Estevinho LM. Honey: another alternative in the fight against antibiotic-resistant bacteria? *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(11):774. Doi: 10.3390/antibiotics9110774.
- (18) Sindi A, Chawn MVB, Hernandez ME, Green K, Islam MK, Locher C, Hammer K. Anti-biofilm effects and characterisation of the hydrogen peroxide activity of a range of Western Australian honeys compared to Manuka and multifloral honeys. *Sci Rep*. 2019;9(1):17666. Doi: 10.1038/s41598-019-54217-8.
- (19) Estevinho L, Pereira AP, Moreira L, Dias LG, Pereira E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(12):3774-9. Doi: 10.1016/j.fct.2008.09.062.

- (20) Bisang R, Lachman J, López A, Pereyra M, Tacsir E. Primeros pasos hacia la diferenciación de la producción de miel uruguaya. [place unknown]: BID; 2022. 53p. Doi: 10.18235/0004216.
- (21) Montenegro G, Pizarro R, Avila G, Castro R, Ríos C. Origen botánico y propiedades químicas de las mieles de la región mediterránea árida de Chile. *Cienc Investig Agrag*. 2003;30(3):161-74.
- (22) International Trade Centre. Lista de los países exportadores para el producto seleccionado en 2023: Producto 0409 Miel natural. In: Trade Map: estadísticas del comercio para el desarrollo internacional de las empresas [Internet]. Geneva: ITC; [cited 2025 Jan 02]. Available from: [https://www.trademap.org/Country\\_SelProduct.aspx?nvpm=3%7c%7c%7c%7c%7c0409%7c%7c%7c4%7c1%7c1%7c2%7c1%7c1%7c2%7c1%7c1%7c1](https://www.trademap.org/Country_SelProduct.aspx?nvpm=3%7c%7c%7c%7c%7c0409%7c%7c%7c4%7c1%7c1%7c2%7c1%7c1%7c2%7c1%7c1%7c1)
- (23) Tamaño G, Cora S. Caracterización y valorización de mieles de un área protegida de Uruguay. *INNOTEC*. 2022;23:e598. Doi: 10.26461/23.03.
- (24) Brussa C, Grela I. Flora arbórea del Uruguay: con énfasis en las especies de Rivera y Tacuarembó. Montevideo: COFUSA; 2007. 544p.
- (25) Louveaux J, Vorwohl G. Methods of melissopalynology. *Bee World*. 1970;51(3):125-38.
- (26) Bogdanov S. Harmonised methods of the International Honey Commission [Internet]. [place unknown]: International Honey Commission; 2009 [cited 2025 Jan 02]. 63p. Available from: <https://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf>
- (27) United States standards for grades of extracted honey [Internet]. Washington: USD; 1985 [cited 2025 Jan 02]. 12p. Available from: [https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Extracted\\_Honey\\_Standard%5B1%5D.pdf](https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Extracted_Honey_Standard%5B1%5D.pdf)
- (28) Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965;16:144-58. Doi: 10.5344/ajev.1965.16.3.144.
- (29) Sancho MT, Pascual-Maté A, Rodríguez-Morales E, Osés SM, Escriche I, Periche Á, Fernández-Muiño MA. Critical assessment of antioxidant-related parameters of honey. *Int J Food Sci Technol*. 2016;51(1):30-6. Doi: 10.1111/ijfs.12988.
- (30) Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 10th ed. Wayne: CLSI; 2015. 92p.
- (31) Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard. 3rd ed. Wayne: CLSI; 2017. 14p.
- (32) Estevez MB, Casaux ML, Fraga M, Faccio R, Alborés S. Biogenic silver nanoparticles as a strategy in the fight against multi-resistant salmonella enterica isolated from dairy calves. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:644014. Doi: 10.3389/fbioe.2021.644014.
- (33) Santos E. Fortalecimiento de las capacidades para la gestión ambientalmente adecuada de plaguicidas, incluyendo COPs [Internet]. Montevideo: Ministerio de Salud; 2020 [cited 2025 Jan 02]. 57p. Available from: <https://bit.ly/3ZFF8St>
- (34) Cortelezzi Á, Rava C, Gutiérrez Silva S, Mila F, Gorga L, Laguna H, Barboza N, Ackermann MN. Impactos del cambio climático en el sector agropecuario. In: Anuario OPYPA 2023 [Internet]. Montevideo: MGAP; 2023 [cited 2025 Jan 02]. 12p. Available from: <https://descargas.mgap.gub.uy/OPYPA/Anuarios/Anuarioopypa2023/estudios/1/e1web/1ElImpactos.pdf>
- (35) Corbella E, Cozzolino E, Ramallo G, Maidana M. Conjugar criterios y esfuerzos para fomentar prácticas agropecuarias que tengan en cuenta la biodiversidad, de la cual tanto depende la apicultura: calidad de mieles de Uruguay. *El País Agropecuario* [Internet]. 2002 [cited 2025 Jan 02];8(92):25-8. Available from: <https://ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/10611/1/92.pdf>
- (36) Robinson N, Harper RJ, Smettem KRJ. Soil water depletion by Eucalyptus spp. integrated into dryland agricultural systems. *Plant Soil*. 2006;286:141-51. Doi: 10.1007/S11104-006-9032-4.
- (37) FAO, WHO. Codex Alimentarius: general requirements (food hygiene) [Internet]. Rome: FAO; 2001 [cited 2025 Jan 02]. Available from: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius>

- (38) Ucurum O, Tosunoglu H, Takma Ç, Birlik PM, Berber M, Kolaylı S. Distinctive properties of the pine, oak, chestnut, and multifloral blossom and honeydew honeys. *Eur Food Res Technol.* 2024;250(7):1765-74. Doi: 10.1007/s00217-024-04520-0.
- (39) Sánchez-Martín V, Morales P, González-Porto AV, Iriondo-DeHond A, López-Parra MB, Del Castillo MD, Hospital XF, Fernández M, Hierro E, Haza AI. Enhancement of the antioxidant capacity of thyme and chestnut honey by addition of bee products. *Foods.* 2022;11(19):3118. Doi: 10.3390/foods11193118.
- (40) Cracco P, Cabrera C, Cadenazzi M, Galiotta G, Moreni A, Santos E, Zaccari F. Uruguayan honey from different regions: characterization and origin markers. *Agrocienc Urug.* 2022;26(1):e947. Doi: 10.31285/agro.26.947.
- (41) Faúndez X, Báez ME, Martínez J, Zúñiga-López MC, Espinoza J, Fuentes E. Evaluation of the generation of reactive oxygen species and antibacterial activity of honey as a function of its phenolic and mineral composition. *Food Chem.* 2023;426:136561. Doi: 10.1016/j.foodchem.2023.136561.
- (42) Kunat-Budzyńska M, Rysiak A, Wiater A, Graż M, Andrejko M, Budzyński M, Bryś MS, Sudziński M, Tomczyk M, Gancarz M, Rusinek R, Ptaszyńska AA. Chemical composition and antimicrobial activity of new honey varietals. *Int J Environ Res Public Health.* 2023;20(3):2458. Doi: 10.3390/ijerph20032458.
- (43) Alevia M, Rasines S, Cantero L, Sancho MT, 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):1412. Doi: 10.3390/foods10061412.
- (44) Bucekova M, Jardekova L, Juricova V, Bugarova V, Di Marco G, Gismondi A, Leonardi D, Farkasovska J, Godocikova J, Laho M, Kludiny J, Majtan V, Canini A, Majtan J. Antibacterial activity of different blossom honeys: new findings. *Molecules.* 2019;24(8):1573. Doi: 10.3390/molecules24081573.
- (45) Brudzynski K, Abubaker K, St-Martin L, Castle A. Re-examining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey. *Front Microbiol.* 2011;2:213. Doi: 10.3389/fmicb.2011.00213.
- (46) Fernandes L, Ribeiro H, Oliveira A, Sanches Silva A, Freitas A, Henriques M, Rodrigues ME. Portuguese honeys as antimicrobial agents against *Candida* species. *J Tradit Complement Med.* 2020;11(2):130-6. Doi: 10.1016/j.jtcme.2020.02.007.