



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA DE  
MIELES MEXICANAS DE DIFERENTES ORÍGENES GEOGRÁFICOS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**MARÍA FERNANDA GUERRERO PÉREZ**



Ciudad Universitaria, CDMX

2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** GLORIA DÍAZ RUÍZ  
**VOCAL:** JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ  
**SECRETARIO:** MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA  
**1° SUPLENTE:** MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO  
**2° SUPLENTE:** FEDERICO NIETO PINEDA

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** LABORATORIO 111,  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA,  
UNAM

### **ASESOR DEL TEMA:**

DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ

### **SUSTENTANTE (S):**

MARÍA FERNANDA GUERRERO PÉREZ

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz por su asesoría, apoyo y tiempo brindado para la realización de este trabajo.

A la Dra. Gloria Díaz Ruiz por las cepas bacterianas proporcionadas y por la ayuda en la revisión de este trabajo y a la Dra. Martha Lydia Macías por la revisión de este trabajo.

A la Dra. Sobeida Sánchez Nieto y sus alumnas Montserrat López y Paulina Aguilera por su apoyo en la realización del ensayo de peróxido de hidrógeno.

A los MVZ. Adriana Correa Benítez y Ángel López Ramírez por las muestras proporcionadas que se utilizaron en este trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado a través del proyecto de Ciencia Básica CB-252006. También se agradece el apoyo del proyecto PAIP 5000 9138.

## Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	2
2.1 Definición .....	2
2.2 Historia de la miel: impacto en las antiguas civilizaciones .....	3
2.3 Tipos de abeja melífera.....	4
2.3.1 Abeja <i>Apis mellifera</i> .....	4
2.3.2 Abejas de la tribu <i>Meliponini</i> .....	6
2.4 Producción y comercialización de miel mexicana .....	8
2.4.1 Producción nacional.....	8
2.4.2 Regiones apícolas .....	9
2.4.3 Procesamiento y envasado.....	11
2.5 Composición .....	14
2.6 Propiedades físicas.....	15
2.6.1 Color .....	15
2.6.2 Actividad de Agua .....	15
2.6.3 Viscosidad .....	16
2.7 Composición química.....	16
2.7.1 Humedad .....	16
2.7.2 Azúcares.....	17
2.7.3 Compuestos fenólicos.....	17
2.7.4 Aceites esenciales .....	18
2.7.5 Ácidos orgánicos.....	19
2.7.6 Productos de reacción de Maillard.....	19
2.8 Actividad antimicrobiana de la miel.....	19

2.9 Actividad antioxidante .....	21
2.10 Calidad de la miel.....	21
2.11 Análisis melisopalinológico .....	22
3. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.....	24
3.1 Objetivo general.....	24
3.2 Objetivos particulares.....	24
3.3. Hipótesis de Trabajo .....	24
3.4. Justificación.....	25
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	26
4.1. Recolección.....	26
4.2. Evaluación Sensorial.....	26
4.3. Determinación de la mínima concentración inhibitoria. ....	26
4.4. Determinación de la capacidad antioxidante.....	27
4.5. Determinación del contenido de fenoles totales.....	28
4.6. Determinación del contenido de peróxido de hidrógeno .....	28
4.7 Determinación de la mínima concentración inhibitoria posterior al tratamiento de las mieles con catalasa. ....	30
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
5.1 Caracterización organoléptica.....	32
5.2 Determinación del contenido de fenoles totales.....	36
5.3 Determinación del contenido antioxidante. ....	39
5.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de las mieles sin tratar y tratadas con catalasa sobre el crecimiento de bacterias patógenas.....	44
5.5 Determinación del contenido de peróxido de hidrógeno. ....	52

5.6 Comparación entre contenido de fenoles, antioxidantes totales, peróxido de hidrógeno y MIC de las muestras.....	56
6. CONCLUSIONES.....	59
7. PERSPECTIVAS.....	61
8. BIBLIOGRAFÍA .....	62
9. ANEXOS .....	69

## Índice de Gráficas.

Gráfica 1. Curva de calibración de fenoles totales .....	36
Gráfica 2. Resultados del ensayo para la cuantificación de fenoles totales en las muestras de miel .....	37
Gráfica 3. Curva de calibración de concentración de antioxidantes .....	39
Gráfica 4. Resultados del ensayo para la cuantificación de antioxidantes totales en las muestras miel .....	40
Gráfica 5. Comparación entre el contenido de antioxidantes y fenoles totales en las muestras de miel .....	43
Gráfica 6. Concentración mínima inhibitoria de las muestras de miel a diferentes concentraciones sobre bacterias patógenas .....	49
Gráfica 7. Curva de calibración con estándar de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a ~3%.....	52
Gráfica 8. Concentración de peróxido de hidrógeno en las muestras de miel .....	53

## Índice de figuras.

Figura 1. <i>Apis mellifera</i> .....	5
Figura 2. <i>Melipona beecheii</i> (a) y <i>Scaptotrigona</i> spp. (b) .....	6
Figura 3. <i>Scaptotrigona mexicana</i> en colmena .....	7
Figura 4. Mapa de regiones apícolas en México .....	11
Figura 5. Diagrama de flujo del proceso de la miel .....	13
Figura 6. Reacción de aclaramiento de DPPH .....	27
Figura 7. Reacción entre reactivo Amplex® red y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en presencia de peroxidasa .....	29
Figura 8. Diagrama de procedimiento experimental.....	31

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Principales estados productores de miel .....	9
Cuadro 2. Caracterización organoléptica de las muestras de miel con diferente procedencia de la República Mexicana.....	33
Cuadro 3. Resultados de MIC de las muestras activas probadas sobre <i>Listeria monocytogenes</i> (clave CFQ 103).....	44
Cuadro 4. Resultados de MIC de las muestras activas probadas sobre <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium (cepa 14028).....	45
Cuadro 5. Resultados de MIC de las muestras activas probadas sobre <i>Bacillus cereus</i> (cepa 11778). .....	46
Cuadro 6. Resultados de MIC de las muestras activas probadas sobre <i>Escherichia coli</i> EPEC (cepa 95222). .....	46
Cuadro 7. Resultados de MIC de las muestras activas probadas sobre <i>Escherichia coli</i> ETEC (cepa 95238). .....	47
Cuadro 8. Resultados de MIC de las muestras activas probadas sobre <i>Shigella dysenteriae</i> (cepa 58a).....	47
Cuadro 9. Resultados de MIC de las muestras activas probadas sobre <i>Escherichia coli</i> resistente a ampicilina (cepa 108412). .....	48

## **Lista de abreviaturas**

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

EPEC: Enteropatógena

ETEC: Enterotoxigénica

FMVZ: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

HMF: 5-hidroximetilfurfuraldehído

HRP: peroxidasa de rábano picante

ICBB: International Commission for Bee Botany

MIC: Concentración mínima inhibitoria

T: tonelada

UAF: Unidad Arbitraria de Fluorescencia

UV-Vis: Ultravioleta visible

$\lambda$ : longitud de onda

## 1. INTRODUCCIÓN

México es uno de los países con mayor producción de miel a nivel mundial. De acuerdo con la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) nuestro país se ubica en quinto lugar como productor y en tercer lugar como exportador de miel<sup>1</sup>. Hace dos décadas, el 76.8% de la producción de miel en México se destinaba al mercado internacional; sin embargo, en la actualidad más de la mitad de la producción se comercializa en el mercado interno. Debido a la estacionalidad de la cosecha, las características que la miel adquiere son determinadas por factores de la región como la temperatura, humedad, altitud, luminosidad, y origen monofloral y multifloral. Estos factores tienen gran influencia en las características organolépticas y fisicoquímicas de la miel, principalmente color, sabor, aroma, grado de humedad y contenido de azúcares, los cuales le proporcionan a la miel cualidades que le dan gran competitividad en el mercado internacional<sup>2</sup>.

Una de las principales limitantes de los productores mexicanos es que no cumplen con la normatividad del origen floral de sus mieles, establecida por la Comisión de Botánica Apícola y por el IBRA (International Bee Research Association) por lo que la miel mexicana a pesar de ser de buena calidad, no tiene el valor agregado que resultaría de la certificación del origen floral<sup>3</sup>.

La flora melífera es responsable de gran parte de las características fisicoquímicas y organolépticas de la miel, dentro de estas se encuentra la actividad antioxidante. Por otro lado, las técnicas de almacenamiento, la especie productora y las condiciones climáticas son responsables de otro tipo de propiedades como el potencial antibacteriano y ciertos aspectos del perfil sensorial. Estos aspectos contribuyen en el posicionamiento de la miel como un alimento funcional, los cuales son alimentos en los que algunos de sus componentes pueden contribuir a la manutención de la salud y el bienestar, a la disminución del riesgo de enfermar, o ambas<sup>4</sup>. Lo cual podría ser una de las principales razones de los consumidores para su compra.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Definición

La miel es una sustancia natural y dulce producida principalmente por abejas del género *Apis mellifera* y diferentes especies de abejas sin aguijón, a partir del néctar de las flores y de otras secreciones extra florales que las abejas liban y transforman al combinarlas con sustancias propias y que posteriormente depositan, deshidratan, almacenan y conservan en panales para su maduración<sup>5,6</sup>.

Después de obtener néctar de una flor, las abejas recolectoras vuelan de vuelta al panal que puede estar en un árbol hueco, una cavidad natural, u otro panal hecho por el hombre. La abeja recolecta el néctar en un reservorio de su aparato digestivo denominado buche. Una vez en el panal, regurgita el fluido y pasa a través de su probóscide a una o más abejas, que la tragan y la regurgitan también. Cada que una abeja succiona el líquido a través de su probóscide hacia el buche, una pequeña cantidad de proteínas se añade y agua se evapora. Las proteínas añadidas son enzimas que convierten los azúcares en monosacáridos. El líquido se traslada a través de una cadena de abejas de esta forma antes de ser colocada en una celda del panal. Después de que se coloca en una celda, las abejas continúan procesándolo y más agua se evapora. La temperatura del panal donde se almacena se encuentra alrededor de 35°C. Esta temperatura y la ventilación producida por abejas evaporan mayor cantidad de agua de la miel. Cuando el contenido de agua es menor a 20%, las abejas sellan la celda con cera. En este momento la miel se considera madura y no fermentará. De esta forma las abejas crean un almacén de alimento concentrado y empacado en un mínimo espacio, que puede ser reservado hasta que sea necesario en época sin floración, o durante el invierno. La miel se produce y almacena de forma que no se deteriorará en calidad, no enmohecerá, y no fermentara durante el almacenamiento<sup>7</sup>.

## **2.2 Historia de la miel: impacto en las antiguas civilizaciones**

En las más grandes civilizaciones se ha encontrado el uso de la miel como importante fuente de alimento y como símbolo religioso, espiritual y terapéutico.

En la antigua civilización egipcia se cree que además de endulzante de alimentos, la miel era ofrecida en grandes cantidades como tributo a sus dioses, también se ha encontrado evidencia de su uso en momificación, como agente emulsificante de pinturas, y para ser enterrada con los muertos y así asegurar su sustento en el más allá. Se cree que en el antiguo Egipto era un lujo. Los faraones la utilizaban en la celebración del matrimonio. Los recién casados tomaban hidromiel durante un mes después de la boda para asegurar suerte y felicidad, este ritual originó el término “luna de miel”. En la antigua medicina egipcia, la miel era el ingrediente más frecuente en las recetas médicas. De acuerdo al Papiro Ebers (1550 A.C.), antiguo tratado médico, se usaba con resultados efectivos en aplicación tópica para curación de heridas, en el tratamiento de dolor abdominal, y como ungüento para piel seca, heridas, quemaduras, irritación y enfermedades oculares.

Los antiguos egipcios no eran los únicos en utilizar la miel como remedio. Los antiguos griegos, romanos y chinos la establecieron como remedio tópico antiséptico para heridas, irritación y úlceras. En China en particular se usó para prevenir cicatrices, remover pecas y mejorar la apariencia de la piel en general; así como tratamiento contra la inflamación de los ojos, afecciones de la garganta y boca y para remover helmintos parásitos. Aristóteles creía que el consumo de miel prolongaba la vida; Dioscórides, un físico griego que compiló “*De Materia Medica*”, la fuente clásica de terminología botánica moderna y texto líder farmacológico hasta el siglo XV, declaró que la miel podía utilizarse como tratamiento para enfermedades estomacales, heridas infectadas, inflamación de oído, hemorroides y para detener la tos. En la Antigua Roma la miel tenía un importante papel en su gastronomía así como en la conservación de sus alimentos, los vegetales y frutas se sumergían en miel para su preservación.

En la región tropical de México se obtuvo miel principalmente de dos géneros, *Melipona* y *Trigona*. El cultivo de miel de *Melipona* se hacía en troncos huecos, sellados con lodo y apilados uno sobre otro, o también en ollas de barro (método utilizado actualmente). La miel era el principal producto de la colmena, la cual se utilizaba en la gastronomía, medicamentos y ritos. Debido a que su contenido de agua es mayor a la miel producida por la abeja europea, su fermentación era más fácil, factor que permitió el desarrollo de bebidas como el balché y el xtabentún. En el siglo XVI el médico indígena Martín de la Cruz estableció, en el *Códice de la Cruz Badiano*, las bases para el empleo de la miel en la elaboración de medicamentos para diversas afecciones como: dolor de garganta, obstrucción del conducto urinario, e infecciones gastrointestinales<sup>8,9</sup>.

## **2.3 Tipos de abeja melífera**

### **2.3.1 Abeja *Apis mellifera***

La abeja *A. mellifera* llegó junto con los españoles a América, conocida como abeja común europea (Figura 1); sin embargo, con la institución de la caña de azúcar y el desarrollo de grandes haciendas azucareras, la miel pasó a segundo lugar nacional como endulzante. Su verdadera introducción comenzó en Florida a finales del siglo XVII (cuando esta península aún era posesión española) sin mucho éxito. Posteriormente, a mediados del siglo XVIII se introducen en Cuba, y se cree probable que fuera entonces cuando se propagaron en la Nueva España desde Cuba. En Yucatán llegó desde EUA a fines del siglo XIX y principios del XX, por lo que en la península de Yucatán se le conoce como “abeja americana”<sup>9</sup>.



**Figura 1. *Apis mellifera***

Maldonado A. 2005. Obrera en huerta con frutales. (Fotografía). Recuperado de:  
<https://biocostagranadinafauna.blogspot.mx/2013/08/abeja-melifera-apis-mellifera.html>

Por su parte la abeja italiana (*Apis ligustica*), especie con la mayor distribución mundial debido a su docilidad y productividad, llegó a México después de 1891. Con el desarrollo de nuevas tecnologías apícolas, México destacó en la producción de miel y se posicionó dentro de los primeros exportadores a nivel mundial.

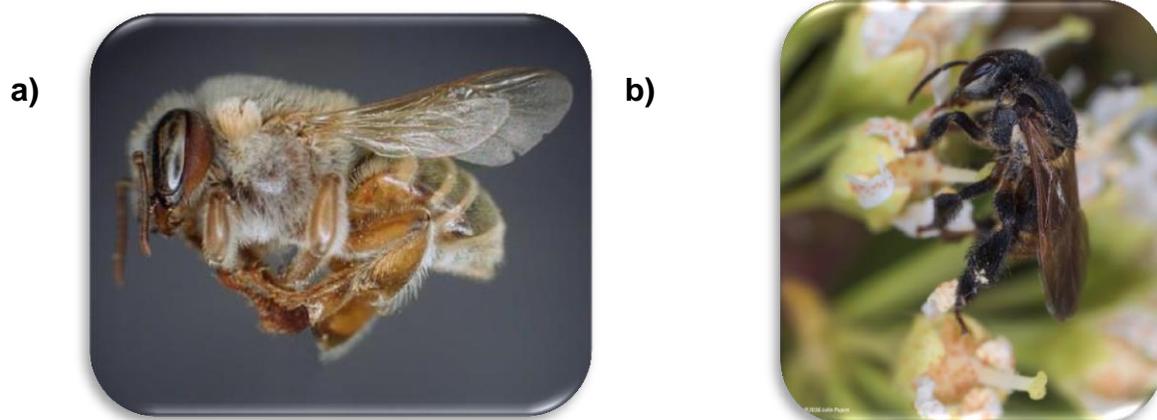
En 1956 se introdujeron abejas africanas (*Apis mellifera scutellata*) en Brasil con el objetivo de lograr un mejoramiento genético que favoreciera la adaptación y la producción de la abeja europea; sin embargo, en lugar de esto se obtuvieron abejas africanizadas con un comportamiento agresivo y migratorio y con tendencia a abandonar las colmenas, además de baja productividad. Su migración ha propagado la especie a través de América Central y del Sur (con excepción de Chile), incluyendo a México, en donde se dispersó a finales de 1986. Como consecuencia de esto la productividad decayó, aunque después remontó<sup>10,11</sup>.

Actualmente la apicultura en México se basa en las abejas europeas de las especies *Apis mellifera* y *Apis ligustica*<sup>10</sup>.

### 2.3.2 Abejas de la tribu *Meliponini*

Las abejas procedentes de la tribu *Meliponini*, comúnmente conocidas como abejas sin aguijón, se diferencian de *A. mellifera* a partir del nivel taxonómico subfamilia. A pesar de que los estándares internacionales establecidos en la Comisión del *Codex Alimentarius*<sup>6</sup> sólo se han establecido para la miel de la especie *A. mellifera*, las abejas sin aguijón también son productoras de miel. Los principales géneros productores son: *Tetragonisca*, *Melipona*, *Scaptotrigona* y *Plebeia* en América; *Meliponula* en África; y *Tetragonula* en Asia<sup>12</sup>.

En México se han encontrado 46 especies, de las cuales el 30.4 % son especies endémicas. De estas especies destacan *Melipona beecheii* encontrada sobretodo en la Península de Yucatán (Figura 2a), *Scaptotrigona mexicana* encontrada en el Golfo y Centro de México (Figura 2b) y *Scaptotrigona hellwegeri* distribuida en Guerrero<sup>13</sup>.



**Figura 2.** *Melipona beecheii* (a) y *Scaptotrigona* spp. (b)

Ayala R. s/f. *Melipona beecheii*. (Fotografía). Recuperado de:  
<http://apoidea.mvspecies.info/taxonomv/term/18327> 27 Octubre 2017.

Mundialmente se conocen 64 géneros y 500 especies de abejas sin aguijón y se estima que visitan el 50% de la flora tropical en búsqueda de néctar y polen, sin embargo hay pocos estudios al respecto. Tienen una gran contribución en la

biodiversidad de ecosistemas tropicales y en el aumento del rendimiento de la producción de cultivos agrícolas como el del café, habiéndose reportado hasta un incremento del 20%<sup>13</sup>.

En los últimos años, ha surgido gran incertidumbre debido a un importante decremento en la meliponicultura, sobretodo en la península de Yucatán, debido a cambios ambientales, negligencia al sobreexplotar la cosecha, introducción de otras especies de abeja como *A. mellifera* en ecosistemas donde residen abejas meliponas, división de las colonias para duplicarlas y uso de agroquímicos<sup>12,13</sup>.



**Figura 3.** *Scaptotrigona mexicana* en colmena

Jiménez J. (2017). Cámaras de cría de *Scaptotrigona mexicana*. Fotografía tomada por Jorge Jiménez Díaz

Estudios han documentado una alta proporción de sustancias bioactivas en las mieles de *Melipona*. Entre estos compuestos los ácidos fenólicos, flavonoides y enzimas glucosa oxidasa y catalasa reciben especial atención por su rol en prevención de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo<sup>5</sup>.

## **2.4 Producción y comercialización de miel mexicana**

La demanda nacional de miel es baja, su uso se centraliza en cosméticos, repostería y confitería. Del total de la producción nacional, el 58% en promedio se exporta, hay muy pocas importaciones (menos de 17 toneladas en promedio) y el consumo doméstico equivale prácticamente a la producción no exportada. Para la comercialización nacional está la NMX-F-036-981, la cual principalmente establece que el producto debe estar libre de materia extraña (comúnmente fragmentos de insectos y excretas de roedores), libre de aditivos alimentarios para su conservación, agua, almidón, melazas, glucosa, dextrinas o azúcares, y sin contaminantes químicos como plaguicidas en cantidades que puedan presentar un riesgo para la salud<sup>14</sup>. Para que la miel obtenga un certificado de exportación es necesario que cumpla con las normas oficiales mexicanas zoosanitarias, de calidad, de etiquetado y para control de plagas. México trabaja en la creación de un programa nacional de inocuidad y calidad de la miel en el que se apliquen las buenas prácticas para la producción y manufactura de la miel, de manera que se logren homologar normas mexicanas con normas internacionales y de esa forma garantizar la calidad de la miel procedente de este programa<sup>15</sup>.

### **2.4.1 Producción nacional**

La producción de miel en México ha disminuido a lo largo de su historia comercial. Los principales factores causantes de este descenso en la producción fueron tanto internos como externos; por un lado comenzó la africanización de las colonias y la presencia del ácaro *Varroa destructor*, hechos que marcaron el comienzo de dicha tendencia de 1992 a 1995; y por otro lado, la llegada de huracanes con lo que se registró la producción más baja en 1996 y posteriormente de 2002 a 2005. Otros factores determinantes han sido: la deforestación de selvas y bosques, que ha provocado una baja disponibilidad de flora polinífera en regiones como la costa de Guerrero, Chiapas, Oaxaca, Tabasco, Michoacán, y la Península de Yucatán, las heladas tempranas, la sequías en el norte del país, el exceso de lluvias y otras consecuencias indirectas del cambio climático. Todo esto ha impedido que se alcancen los niveles de producción del pasado<sup>16</sup>. Actualmente, la mayor parte de

la producción anual nacional se concentra en pocos estados de la República, a continuación se muestra en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Principales estados productores de miel (SAGARPA, 2015).

<b>Estado</b>	<b>Producción (T)</b>
Yucatán	9654
Jalisco	7076
Campeche	7074
Chiapas	5117
Veracruz	4124

#### **2.4.2 Regiones apícolas<sup>11</sup>**

México se divide en 5 regiones apícolas que se caracterizan por sus diferentes climas, suelo, vegetación y sistemas de producción.

##### **2.4.2.1 Región norte**

Región con mayor extensión, aproximadamente 930 000 km<sup>2</sup>. Posee vegetación de tipo xerófila, con grandes áreas de pastizal, bosque espinoso y de coníferas. Se estima que en esta región existen un total de 156 498 colmenas que obtienen anualmente alrededor de 3 571 toneladas de miel con un rendimiento promedio por colmena de 23 Kg. Su apicultura esta poco desarrollada debido a que presenta una estación invernal con condiciones adversas.

##### **2.4.2.2 Región central**

Denominada meseta central, con una extensión de aproximadamente 390 000 km<sup>2</sup>. La vegetación predominante es matorral serófilo, bosque espinoso, pastizal, bosque de coníferas, de encinos y tropical caducifolio. Se estima que cuenta con

444 897 colmenas, que producen al año 12 392 toneladas de miel con un rendimiento promedio por colmena de 28 Kg.

#### **2.4.2.3 Región del Pacífico**

Región que comprende desde la vertiente de la Sierra Madre Occidental hasta el Océano Pacífico, y desde el estado de Sinaloa hasta la frontera con Guatemala. Tiene un área de 260 000 km<sup>2</sup> aproximadamente, su vegetación predominante son los bosques tropicales caducifolios y subcaducifolios. Se estima que cuenta con 377 276 colmenas con una producción de 12 226 toneladas de miel y con un rendimiento de 32 Kg por colmena.

#### **2.4.2.4 Región del Golfo**

Región que va de la Sierra Madre Oriental hasta la costa del Golfo de México, con un área de 250 000 km<sup>2</sup>. Tiene como principales ecosistemas el bosque tropical perennifolio, con áreas de bosque tropical caducifolio. En el extremo norte se presenta vegetación xerófila y bosque espinoso. Se estima que existen 271 307 colmenas con una producción de 10 148 toneladas de miel anuales y con un rendimiento de 37 Kg por colmena.

#### **2.4.2.5 Región de la península de Yucatán**

Comprende los estados de Yucatán, Campeche y Quintana Roo, que son productores de miel tradicionales. Tiene una superficie aproximada de 140 000 km<sup>2</sup>. Su vegetación predominante en el noreste es bosque tropical caducifolio con regiones amplias de bosque tropical perennifolio. Es la región productora de miel más importante, se cosechan 20 553 toneladas de miel al año con un rendimiento por colmena de 41 Kg, lo cual representa la mayor producción en la menor superficie. El 95% de esta producción se destina al mercado internacional.



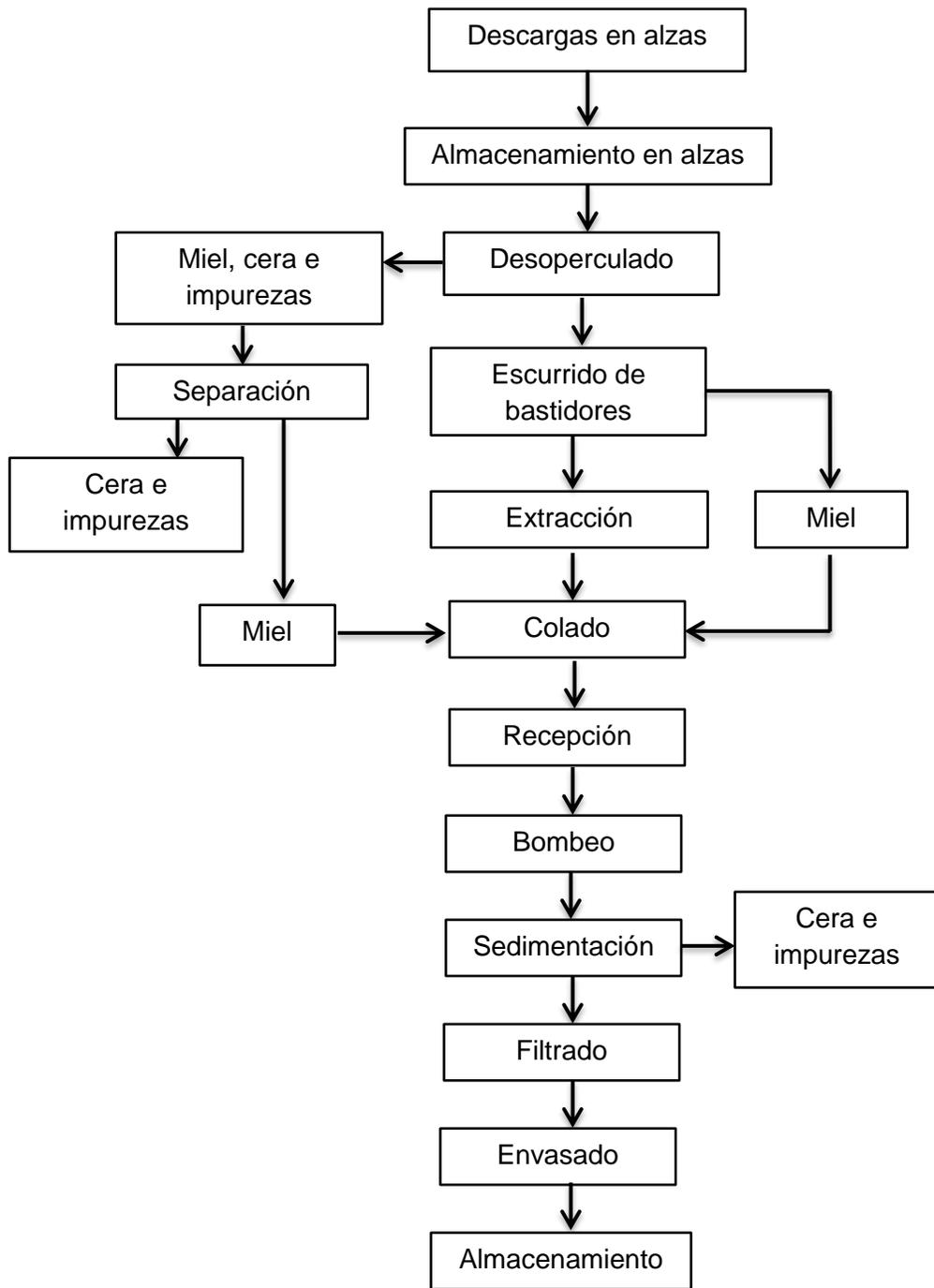
**Figura 4.** Mapa de regiones apícolas en México

### 2.4.3 Procesamiento y envasado

Para obtener un producto final que pueda ser comercializado tanto nacional como internacionalmente se deben cumplir buenas prácticas de manufactura en todas las etapas del proceso.

En la Figura 5 se puede observar el diagrama de flujo del proceso de la miel en México. La descarga en alzas debe realizarse en áreas exclusivamente habilitadas, los apicultores deben utilizar delantales y charolas de salvamiel limpios, y la miel no debe mezclarse con la miel que se extraiga posteriormente de los bastidores. Las alzas no deben apoyarse sobre el piso. Para el almacenamiento en alzas se debe mantener una humedad relativa menor al 50% y una temperatura entre 28°C y 35°C. Se debe evitar el almacenamiento en alzas de más de dos días. El desoperculado consiste en la remoción de los opérculos con los que las abejas cierran las celdas del panal una vez que la miel maduró. Se deben utilizar utensilios y maquinaria de acero inoxidable de grado alimentario. Para la separación de la cera y la miel se recomiendan separadoras mecánicas de cera-miel centrífugas que trabajan en frío, ya que el calor podría afectar la calidad de la miel. En el escurrido de bastidores se debe evitar la exposición de la miel a

factores contaminantes, por lo que es necesario mantener el lugar sanitizado y aislado de posible contaminación. Posteriormente, la extracción se realiza en recipientes cilíndricos que se colocan en una canastilla en la que se depositan los bastidores desoperculados para extraer la miel por fuerza centrífuga. El extractor debe ser de acero inoxidable, grado alimentario y debe de estar limpio. Después, se lleva a cabo el colado, que es una práctica que elimina fragmentos de cera y otras impurezas provenientes del proceso de extracción y que utiliza una malla con aberturas máximas de 3 x 3 mm por cuadro. La recepción de la miel se hace en tanques de acero inoxidable con doble pared, con regulador de temperatura (para mantener la miel a 28°C) y sellado para evitar entrada de contaminantes. En casos necesarios se puede instalar un sistema de bombeo automático, el cual debe adecuarse a la capacidad y volumen de la miel que se procese y ubicarse fuera de los depósitos de miel para evitar contaminación. La sedimentación es el proceso mediante el cual se logra la separación de partículas e impurezas presentes en la miel a través del reposo, sin dejarla más de 2 días. El filtrado de la miel se realiza con mallas de acero inoxidable con abertura de 100 micras, los filtros deben ser reemplazables y lavables. Por último, el envasado se puede realizar en tambores o en frascos. La miel a envasar debe estar limpia, fluida y exenta de residuos. Es conveniente realizar el muestreo de cada lote. La miel debe acondicionarse para su envasado mediante calentamiento, homogeneizado, espumado y filtrado. El calentamiento de la miel permite una mayor fluidez y facilita los procesos de homogeneizado, filtrado y envasado. Cuando la miel ha cristalizado en los tambores, debe someterse a un proceso de calentamiento, controlando la temperatura a un máximo de 50°C durante 24 horas. Para la pasteurización y/u homogeneizado de la miel es necesario elevar la temperatura a 60°C durante un máximo de 30 minutos en baño maría, con un sistema de mezclado lento. Al finalizar este proceso se origina la suspensión de numerosas partículas, por lo que se forma una capa de espuma que debe retirarse con una pala de acero inoxidable<sup>15</sup>.



**Figura 5.** Diagrama de flujo del proceso de la miel<sup>15</sup>

## 2.5 Composición

La miel es consumida a nivel mundial por ser un producto natural con una amplia gama de aromas y dulce sabor, pero más allá de sus atributos sensoriales es apreciada por su alto nivel nutritivo y por sus beneficios a la salud, los cuales se relacionan con su contenido antioxidante, potencial bacteriostático, y propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas. Su perfil nutrimental consiste de una solución saturada de azúcares, principalmente de fructosa y glucosa, y de otros componentes minoritarios, de los cuales destacan los compuestos fenólicos. Su composición es variable y depende primeramente de su origen floral y de la especie productora, aunque factores ambientales y estacionales también influyen en su composición y efectos biológicos. Diversos estudios han demostrado que el potencial antioxidante de la miel se relaciona con su contenido fenólico total y éste a su vez con tonalidades oscuras<sup>17</sup>.

Su composición es especialmente dependiente de su origen floral o botánico, pero generalmente se aproxima de un 75% a 80% de carbohidratos, 17% a 20% de agua, y 1% a 2% de cenizas junto con materia orgánica. Dicha materia orgánica incluye al menos 200 sustancias, entre ellas se pueden encontrar aminoácidos, proteínas, vitaminas, enzimas, ácidos orgánicos, pigmentos, fenoles, vitaminas, productos de la reacción de Maillard y compuestos volátiles. El contenido proteico es normalmente menor al 0.5% y el contenido de cenizas oscila entre 0.04% y 0.2%, y depende del tipo de suelo en el que se localiza la planta de la cual la abeja obtuvo el néctar. Los compuestos minerales mayoritarios en la miel son  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ , seguidos de concentraciones menores de  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Cu^+$ . El contenido de fenoles totales se relaciona con el color oscuro en la miel y con su actividad biológica. La composición química determina las características fisicoquímicas en la miel, como color, reología, conductividad eléctrica, pH y actividad de agua, y a su vez las propiedades físicas de la miel son factores substanciales que determinan su precio en el mercado global y la aceptabilidad de los consumidores<sup>8,18,19</sup>.

En comparación con *A. mellifera*, las diferencias más relevantes con la miel de meliponinos, previamente reportada, son los valores altos en contenido de agua, acidez libre, conductividad eléctrica, maltosa y nitrógeno, así como bajos valores de diastasa en miel de especies del género *Melipona*, pero no en otros géneros de la tribu *Meliponini*<sup>20,21</sup>.

## **2.6 Propiedades físicas**

### **2.6.1 Color**

Un factor importante en la calidad de la miel es el color. Su origen floral, su composición mineral y cualquier tipo de procesamiento con calor pueden afectar el color. Los pigmentos provenientes del origen floral de la miel, como son clorofilas, carotenos, xantofilas, y pigmentos amarillo-verdes son factores intrínsecos que brindan un color determinado a la miel. Por otra parte, el contenido de polen y de hidroximetilfurfural fungen como factores extrínsecos que también le proporcionan cierta coloración. Estudios previos reportan que las mieles más oscuras contienen un mayor contenido antioxidante que las mieles más claras<sup>8</sup>.

### **2.6.2 Actividad de Agua**

La actividad de agua ( $a_w$ ) se define como la relación entre la presión de vapor de agua en un material y la presión de vapor de agua pura a la misma temperatura. Es la cantidad de agua disponible para microorganismos<sup>22</sup>.

En miel la actividad de agua varía entre 0.562 y 0.620 en el rango de temperatura entre 4°C-37°C. El  $a_w$  necesario para el desarrollo de microorganismos es menor a 0.98 y depende de la clase de microorganismo: cerca de 0.70 para mohos, 0.80 para levaduras y 0.90 para bacterias. En miel es común la presencia de levaduras osmófilas debido a su necesidad obligada de altas concentraciones de azúcar y a que son capaces de crecer a una actividad mínima de agua de 0.6, estas levaduras son la causa de la fermentación de la miel<sup>22</sup>.

El agua en la miel esta principalmente ligada a azúcares por medio de puentes de hidrógeno. Los monosacáridos glucosa (27% - 45%) y fructosa (33% - 42%) son los principales componentes de la miel. En la cristalización de la miel, se cristaliza principalmente la glucosa formando glucosa monohidratada, la fructosa tiene una mayor solubilidad y se mantiene en solución durante más tiempo. El agua ligada a la glucosa en solución se libera durante el proceso de cristalización lo cual provoca el incremento en el  $a_w$ . Las mieles con mayor contenido de agua frecuentemente se separan en una fase cristalizada debajo de otra fase líquida. Esta capa, al contener altos niveles de agua, incrementa el riesgo de fermentación de la miel<sup>22</sup>.

### **2.6.3 Viscosidad**

La viscosidad de la miel depende de una variedad de sustancias. Y por tanto, varía conforme a la composición y particularmente con su contenido de agua y con la temperatura. La viscosidad de la miel es esencial en su procesamiento y su importancia está ligada a sus aplicaciones tecnológicas como extracción, filtración, mezcla y embotellamiento. Si la concentración de agua aumenta, la viscosidad disminuye. Las proteínas y otras sustancias coloidales incrementan la viscosidad pero su concentración en miel puede ser insignificante. El porcentaje de fructosa contenida en miel también se ha visto que es capaz de afectar su viscosidad y propiedades reológicas, conforme aumenta el contenido de fructosa, la viscosidad disminuye<sup>8</sup>.

## **2.7 Composición química**

### **2.7.1 Humedad**

El contenido de humedad es una característica importante en la miel y está en función de factores ambientales y del contenido de humedad del néctar<sup>5</sup>. La miel de *A. mellifera* debe tener un contenido de humedad máxima de 20% según la

norma NMX-F-036<sup>14</sup>. Cuando excede este 20% es probable que se suscite su fermentación, en particular cuando la cantidad de levaduras osmófilas es alta<sup>5</sup>.

### **2.7.2 Azúcares**

La miel es una de las mezclas más complejas de la naturaleza y consiste principalmente de carbohidratos. En general, la miel es una solución sobresaturada de azúcares, y éstos son los principales componentes de ésta, siendo cerca de 95 g/100 g materia seca. Los azúcares mayoritarios son fructosa y glucosa, siendo el 85% de los sólidos en la miel. La fructosa es el componente dominante en casi todos los tipos de miel. Estudios han sugerido la presencia de rafinosa como azúcar minoritario en la miel, pero en dado caso, también se esperaría encontrar galactosa por acción enzimática; sin embargo la galactosa no se ha observado en cromatografía en papel ni mediante cromatografía de gases<sup>23</sup>. White y Hoban (1959) confirmaron la presencia mayoritaria de sacarosa y maltosa e identificaron otros cuatro disacáridos adicionales que son isomaltosa, maltulosa, nigerosa y turanosa mediante el método de adsorción selectiva cromatográfica y posterior cromatografía en papel y cromatografía en columna<sup>24</sup>. Siddiqui y Furgala (1968) reportaron la identificación de nueve trisacáridos, un tetrasacárido y un pentasacárido, los cuales se listan a continuación: melecitosa, 3- $\alpha$ -isomaltosilglucosa, maltotriosa, panosa, isomaltotriosa, erlosa, teanderosa, isopanosa, centosa, isomaltotetraosa e isomaltopentaosa. Además, la presencia de azúcares y la relación fructosa/glucosa puede ser usada para determinar la adulteración de miel<sup>25</sup>.

### **2.7.3 Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos en general exhiben gran actividad biológica y actúan como antioxidantes naturales, actividad que ha sido probada a través de su capacidad antirradicalaria, atrapante de peróxido, anticancerígena, antimicrobiana y curativa en el caso de heridas. Los compuestos fenólicos incluyen diferentes subclases las cuales son flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas, estilbenos, lignanos, taninos y polifenoles. Su composición depende de la fuente floral de la

cual se extrae el néctar, de factores estacionales, ambientales y del origen geográfico; su capacidad antioxidante se puede alterar al procesar la miel y/o al someterla a condiciones inadecuadas de almacenamiento<sup>8</sup>.

Al haber gran variedad en la fuente botánica de las mieles, éstas no sólo difieren en su composición química, propiedades físicas y sabor, sino también en su actividad biológica. Por lo tanto, se espera que las propiedades de la miel varíen dependiendo de su origen geográfico. Se sabe que los principales fitoquímicos reportados en la miel son los compuestos fenólicos. El contenido total de compuestos fenólicos dependiendo de la fuente botánica y de la región de la que se colecta va de 46.0 µg/g a 753 µg/g y representa del 0.1% al 0.5% del total de miel. En la actualidad cerca de 25 - 30 compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) han sido caracterizados en diferentes mieles, muchas de ellas uniflorales; se ha encontrado tricetina, quercetina y luteolina en miel de eucalipto, hesperetina en miel de cítricos, quercetina en miel de girasol y ácido abscísico en miel de brezo<sup>26</sup>.

Tradicionalmente, el origen geográfico de la miel se determina con melisopalínología, la cual se lleva a cabo analizando el polen. A pesar de que arroja resultados satisfactorios no es un método confiable, ya que depende de la habilidad y el juicio del experto. Por esta razón, en años recientes, la identificación de compuestos fenólicos parece ser una de las técnicas más prometedoras para la determinación del origen botánico y floral<sup>8</sup>.

#### **2.7.4 Aceites esenciales**

Los aceites esenciales en la miel son compuestos volátiles que juegan un rol importante en el aroma y valor nutricional de la miel. Los compuestos volátiles en la miel consisten principalmente de monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, terpenoides, ácidos grasos, alcoholes, cetonas y aldehídos<sup>8</sup>.

### **2.7.5 Ácidos orgánicos**

Los ácidos orgánicos se encuentran en una proporción cercana al 0.5% (w/w) en la miel y son los que le proporcionan acidez que contribuye al sabor, así como estabilidad ante microorganismos, como catalizadores de reacciones químicas y como antioxidantes. Los ácidos orgánicos pueden funcionar como indicadores del deterioro en almacenamiento y de envejecimiento o para medir pureza y autenticidad. Además de ácidos fenólicos y aminoácidos libres, algunos cuantos ácidos orgánicos como el fórmico, oxálico, málico, maleico, succínico, cítrico, glucónico, glutárico, y fumárico han sido detectados en distintos tipos de miel a diferentes concentraciones<sup>8</sup>.

### **2.7.6 Productos de reacción de Maillard**

La miel también contiene una pequeña cantidad de HMF (hidroximetilfurfural), furfural, melanoidinas y acrilamida. Estos productos surgen de la reacción entre los grupos amino de las proteínas y azúcares reductores y dependen del pH, temperatura y actividad de agua en el medio. HMF es el producto más común de la reacción de Maillard en miel e indica su frescura y la exposición a tratamientos con calor; en el Codex Alimentarius el límite de HMF es de 40 mg/Kg y su contenido es mayor en mieles viejas que en nuevas<sup>8</sup>.

### **2.8 Actividad antimicrobiana de la miel**

La miel ha sido reconocida por sus propiedades medicinales desde la antigüedad. Estudios describen la inhibición del desarrollo de bacterias Gram positivas, Gram negativas, aeróbicas, anaeróbicas e incluso esporas (*Bacillus cereus*) con gran importancia clínica mediante el uso de la miel. Lo cual se debe principalmente a la alta concentración de azúcares reductores, bajo pH, alta viscosidad, baja actividad de agua, y alta presión osmótica; así como el principal factor antibacteriano, la presencia de peróxido de hidrógeno, producido por la actividad de la glucosa-oxidasa<sup>27,28</sup>. La glucosidasa de la miel es secretada por las glándulas hipofaríngeas de la abeja. Ésta rompe los enlaces de la glucosa para formar ácido

glucónico y peróxido de hidrógeno. La actividad de la enzima se anula por la baja actividad de agua y el bajo pH, sin embargo al diluir la miel en agua, ésta se reanuda<sup>29</sup>.

Diversos compuestos químicos han sido descritos como antibacterianos de tipo no peróxido, los cuales se cree que son un grupo de fenoles y flavonoides. Estos compuestos químicos no pierden su estructura bajo altas temperaturas o luz ni son alterados con diluciones. La evidencia más directa sobre la existencia de factores antibacterianos en la miel se ha visto en reportes de actividad persistente en mieles tratadas con catalasa, enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. El método que determina la mínima concentración de miel en la cual se observa clara inhibición de desarrollo microbiano, es ampliamente utilizado por su reproducibilidad y precisión<sup>30</sup>.

En su trabajo de investigación, White y colaboradores encontraron que se necesita una mayor cantidad de catalasa para desintegrar todo el peróxido de hidrógeno que se llega a producir en la miel, también estableció que la catalasa no es altamente efectiva para inactivar niveles fisiológicos de peróxido de hidrógeno<sup>31</sup>. La enzima catalasa, también se ha encontrado en la miel, pero a diferencia de la glucosa oxidasa que proviene de la abeja, ésta proviene del polen de las flores. Se ha encontrado alta actividad de catalasa en el polen pero baja actividad en el néctar. Los niveles más altos de peróxido en mieles se encontraron en las muestras con ausencia de actividad de catalasa. Por lo tanto, es claro que el nivel absoluto de peróxido de hidrógeno en cualquier miel es determinado por sus respectivos niveles de glucosa oxidasa y catalasa. A mayor concentración de glucosa oxidasa, mayor concentración de peróxido de hidrogeno y a menor concentración de catalasa, mayor concentración de peróxido de hidrógeno. Weston propuso que el único compuesto responsable de la actividad antibacteriana de la miel es el peróxido de hidrógeno y la actividad de otras sustancias como los compuestos fenólicos es insignificante en comparación<sup>32</sup>.

## **2.9 Actividad antioxidante**

Los antioxidantes presentes en la miel incluyen compuestos enzimáticos: catalasa, glucosa oxidasa, peroxidasa; y no enzimáticos: ácidos orgánicos, carotenoides, aminoácidos, proteínas, productos de la reacción de Maillard y más de 150 compuestos polifenólicos que incluyen flavonoides, flavonas, catequina, ácido cinámico y derivados. Un alto contenido en estos indicadores asegura una alta actividad antioxidante en la miel<sup>33</sup>. A nivel sensorial, diferentes investigaciones muestran una correlación entre el color de la miel y su capacidad antioxidante, las mieles más oscuras demuestran concentraciones mayores de antioxidantes. A pesar de que la miel no es una fuente predominante de antioxidantes en la dieta, sus deseables características organolépticas facilitan su consumo, a diferencia de algunas fuentes vegetales de antioxidantes<sup>8</sup>.

Durante el calentamiento o incluso durante el almacenamiento puede ocurrir oscurecimiento no enzimático debido a la reacción de Maillard que ocurre entre azúcares reductores y aminoácidos libres y provoca la formación de pigmentos marrón. Se cree que estos pigmentos también actúan como antioxidantes. Sin embargo, en el calentamiento también se pierden antioxidantes naturales, por lo que los MRP's (productos de la reacción de Maillard) podrían o no compensar esta pérdida<sup>34</sup>.

## **2.10 Calidad de la miel**

A pesar de que la calidad de la miel puede ser subjetiva, generalmente se considera de mayor calidad a la miel proveniente de panal. Para posicionarla en el mercado llega a requerir de cierto procesamiento para estabilizarla contra fermentación, remover material extraño y empacarla en su estado líquido o semisólido. Este procesamiento frecuentemente requiere de exposición a alguna fuente de calor, aunado a esto las condiciones de almacenamiento en cualquier punto de la cadena desde producción hasta consumo pueden contribuir a la pérdida de calidad. Gran parte de la evaluación de la calidad está sujeta a factores organolépticos y estado físico como viscosidad, textura, claridad, sabor, aroma y

color. La parte cuantificable reside en la cantidad de 5-hidroximetilfurfuraldehído (HMF) y actividad diastásica, ambas determinaciones establecidas en la legislación de calidad de la miel en los estándares del Codex Alimentarius. Para el HMF se establece un límite de 40 mg/Kg, y en el caso de mieles originarias de zonas tropicales con altas temperaturas es de 80 mg/Kg. La actividad diastásica, por otra parte, no debe ser menor a 8 unidades en la escala de Schade para mieles procesadas o mezcladas y no menor a 3 unidades Schade para mieles con bajo contenido enzimático<sup>6,35</sup>.

El HMF no es un probable constituyente de miel fresca pura que ha sido inmediatamente almacenada por la abeja. Se conoce que se produce a partir de azúcares simples, particularmente fructosa, en medio ácido. La diastasa es el nombre común para la enzima alfa-amilasa. Su función es la digestión de almidón. La medida de la diastasa en la miel se ha usado como indicador en su calidad. Esto se fundamenta en la inactivación de la enzima con el sobrecalentamiento<sup>35</sup>.

Por otro lado, la evaluación sensorial ha surgido como disciplina científica mediante la caracterización y análisis de aceptación o rechazo de un alimento con el fin de asegurar la calidad del producto final y por tanto la preferencia del consumidor. Se ha desarrollado en la industria de alimentos tanto para la optimización y mejora de productos existentes como para la elaboración de nuevos productos<sup>36</sup>.

### **2.11 Análisis melisopalinológico**

La melisopalinología es una rama de la palinología, cuyos dos objetivos mayores son la ubicación geográfica de las mieles y la identificación de los tipos, que se basa en la presencia significativa de ciertos tipos de grano de polen. Se considera de gran importancia para establecer la calidad de la miel. Hay gran cantidad de granos de polen en la miel (provenientes principalmente de las especies vegetales de las que se recolectó el néctar), y elementos provenientes de la mielada (cera, algas y esporas fúngicas) que en conjunto proveen una identidad precisa del ambiente del cual proviene. Por lo tanto, el análisis del polen es una buena fuente

de información del origen geográfico y botánico de la miel, además del análisis sensorial y físico-químico que también son necesarios para un diagnóstico correcto del origen botánico. Además el análisis del polen brinda información sobre el método de extracción, filtración, fermentación, algunos tipos de adulteración y contaminación<sup>37</sup>.

Un método de melisopalinología fue elaborado y propuesto por la ICBB (International Commission for Bee Botany) en 1978. A pesar de que otros métodos han sido propuestos para mejorar la precisión de resultados, el método propuesto por la ICBB permanece siendo el método establecido en la mayoría de los laboratorios Europeos que realizan análisis rutinarios de miel y cumple con el propósito de tipificación del origen botánico y geográfico<sup>37</sup>.

### **3. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN**

#### **3.1 Objetivo general**

Determinar el potencial antioxidante y la actividad biológica de mieles mexicanas de diferente origen botánico, provenientes de abeja melífera europea y abeja melipona, para así otorgarles su valor comercial.

#### **3.2 Objetivos particulares**

1. Realizar la recolección de las muestras de miel en apiarios de las zonas melíferas del Altiplano, Golfo, Costa del Pacífico, Norte y Península de Yucatán.
2. Caracterizar a las mieles por sus propiedades organolépticas.
3. Determinar la capacidad antioxidante de las mieles y sus extractos utilizando el método de blanqueamiento de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).
4. Determinar el contenido de fenoles totales de cada miel.
5. Determinar la mínima concentración inhibitoria de las mieles utilizando como modelo bacterias de importancia en alimentos.
6. Determinar la concentración total de peróxido de hidrógeno de cada muestra de miel.
7. Correlacionar los valores obtenidos de antioxidantes y fenoles, así como de peróxido de hidrógeno y de mínima concentración inhibitoria.

#### **3.3. Hipótesis de Trabajo**

Las mieles de producidas por abejas meliponas y europeas de México tendrán diferente actividad antibacteriana y antioxidante dependiendo de la zona melífera de recolección y de la especie de abeja.

### 3.4. Justificación

En México ha aumentado el consumo de miel per cápita en un 85.9% desde la década de los noventa a la actual, sin embargo, el valor de la producción apícola ha disminuido en los últimos años, este hecho se refleja en la disminución de un 74% de este valor respecto al PIB nacional. Además, el éxito comercial de la venta de miel tiene resultados positivos en México al aumentar la producción de ingresos, generar empleos, impulsar las economías locales y mejorar el bienestar de pequeñas comunidades<sup>2</sup>. Por esta razón el garantizar la calidad y el exponer a la miel como un alimento funcional, certifica su valor y la posicionaría como un producto básico en México.

Por otro lado, se ha registrado un aumento en la resistencia a antibióticos, que se puede definir como la habilidad que tiene un microorganismo, ya sea virus, bacteria, hongo o parásito, de sobrevivir a concentraciones de antibióticos que inhiben a células sensibles de la misma cepa. Las enfermedades gastrointestinales poseen una alta tasa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, siendo la primera causa de mortalidad infantil en el mundo. Por esta razón, ha incrementado la incertidumbre acerca de la resistencia que se ha observado en bacterias entéricas, como *Salmonella* spp, aislada de alimentos, con resistencia a quinolonas, o *Salmonella entérica* Typhimurium con una reducida sensibilidad a ciprofloxacina. Asimismo se han reportado casos de cepas de *Campylobacter* spp. resistentes a fluoroquinolonas y cepas de *Escherichia coli*, aislada de pollos y cerdos, resistentes a quinolonas<sup>35</sup>. Los casos reportados de resistencia han despertado la necesidad de encontrar alternativas que logren complementar a los tratamientos antibióticos que actualmente se utilizan para combatir diversas enfermedades entéricas, y una posible alternativa son los productos naturales.

## **4. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### **4.1. Recolección.**

Las muestras de miel se recolectaron en apiarios ubicados en diferentes zonas melíferas de México por los investigadores Ángel López Ramírez y Adriana Correa Benítez del Departamento de Medicina y Zootecnia de Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM. Otras muestras fueron proporcionadas por Jaqueline Martínez González, María Fernanda Guerrero Pérez de la Facultad de Química de la UNAM y por Jorge Jiménez Díaz de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

### **4.2. Evaluación Sensorial.**

Se usó un método afectivo, que evalúa la respuesta que provoca el producto evaluado en el consumidor. Se reportaron las características iniciales evaluadas solo con la vista y las características después de haber degustado cada muestra de miel. Se reportó una evaluación integral del aroma, sabor y textura de cada una, enjuagando la boca entre cada muestra y en un lugar con condiciones adecuadas para dicha evaluación: sin distracciones, tranquilo, temperatura ambiente (18°C-22°C), iluminación natural, ventilación y paredes de color claro<sup>36,38</sup>.

### **4.3. Determinación de la mínima concentración inhibitoria.**

La concentración mínima inhibitoria (MIC) se midió utilizando el método descrito por Manyi-Loh y colaboradores (2010) con modificaciones. Las bacterias de prueba utilizadas fueron *Salmonella enterica* Typhimurim (cepa ATCC 14028), *Bacillus cereus* (cepa ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (clave CFQ 103 aislada de un alimento), *Shigella dysenteriae* (cepa 58a de atole agrío), *Escherichia coli* ETEC (enterotoxigénica) (cepa 95238 de pozol), *Escherichia coli* EPEC (enteropatógena) (cepa 95222 de pozol) y *Escherichia coli* resistente a ampicilina (cepa 108412 aislada de un caso de diarrea). Para la determinación se utilizaron microplacas estériles de 96 pozos y se realizaron diluciones seriadas

para evaluar a las muestras de miel a distintas concentraciones (25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 0.78, 0.39, 0.195, 0.098 y 0.05%) en caldo BHI (Merck KGaA) como medio de cultivo. Las bacterias se ajustaron a  $0.5 (1 \times 10^6 \text{ UFC/mL})$  en la escala de Mc Farland y se inocularon todas las diluciones con 20  $\mu\text{L}$  de cultivo. Las placas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas. La MIC se definió como aquella concentración a la cual no se observó crecimiento visible o estuvo limitado a una absorbancia de 0.05 a 660 nm. Cada muestra de miel se probó por duplicado, como control positivo se usó una solución de digluconato de clorhexidina al 20% en  $\text{H}_2\text{O}$  (Sigma- Aldrich) y como control negativo se inoculó la bacteria en el medio BHI<sup>28</sup>.

#### 4.4. Determinación de la capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante se determinó mediante el ensayo de aclaramiento del radical DPPH. En este ensayo se mide la capacidad atrapadora del radical libre DPPH. El radical libre color púrpura reacciona con el agente neutralizante para producir 1,1- difenil-2-picrilhidrazina como se puede ver en la Figura 6.

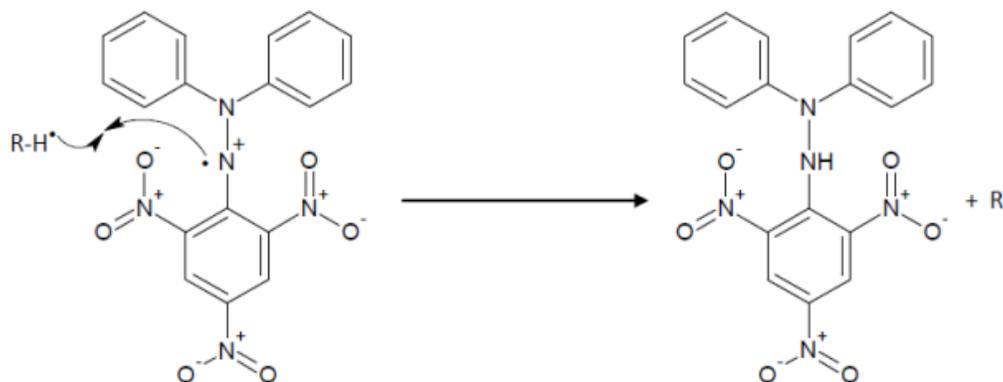


Figura 6. Reacción de aclaramiento de DPPH<sup>39</sup>.

Se utilizó el protocolo descrito por Thaipong y colaboradores. Como primer paso, se realizó una curva de calibración en un rango de concentración de  $0.0732 \mu\text{g/mL}$

a 100 µg/mL La curva se realizó utilizando como estándar Trolox® (Sigma-Aldrich), antioxidante análogo hidrosoluble de alfa-tocoferol (Vitamina E). La reacción se realizó utilizando 100 µL de una disolución 0.208 mM de DPPH y 100 µL de la muestra diluida en agua (1:1). Se midió la absorbancia transcurridos 20 minutos de reacción en un espectrofotómetro Epoch (BioTek) UV-Vis para microplacas a una longitud de onda de  $\lambda = 517$  nm. Las determinaciones de cada muestra se expresaron como mg equivalentes de Trolox®/mL de muestra y se realizaron por triplicado<sup>40</sup>.

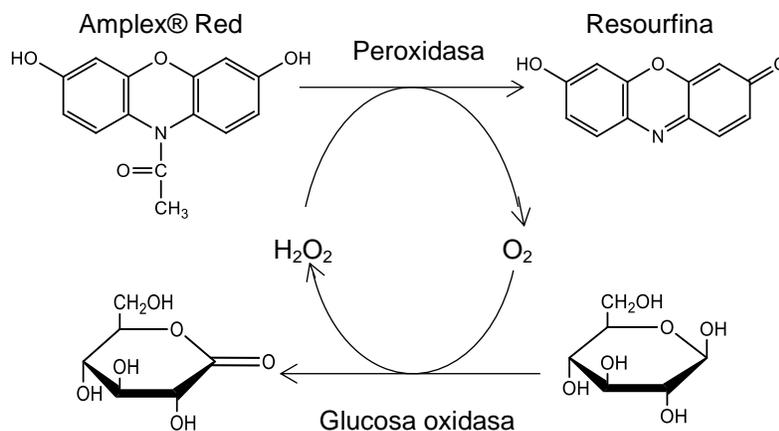
#### **4.5. Determinación del contenido de fenoles totales.**

El contenido de fenoles totales se determinó espectrofotométricamente mediante el método de Folin-Ciocalteu siguiendo la metodología descrita por Singleton y colaboradores (1999) con modificaciones. Como primer paso se realizó una curva de calibración utilizando como estándar ácido gálico (Sigma-Aldrich), en un intervalo de concentración de 0.117 µg/mL a 60 µg/mL. Los resultados del contenido de fenoles totales se expresan en equivalentes de ácido gálico (µg de equivalentes de ácido gálico/mL de muestra) y se obtuvieron interpolando cada absorbancia en la curva de calibración. La reacción se realizó utilizando 150 µL de agua desionizada, 20 µL de reactivo de Folin (fosfomolibdato y fosfotungstato) y 20 µL de la muestra diluida con H<sub>2</sub>O desionizada en proporción (1:1) y se incubó durante ocho minutos en la oscuridad. Finalmente, se adicionaron 10 µL de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% y la mezcla se mantuvo en la oscuridad por una hora. Se midió la absorbancia transcurrida la hora de reacción en un espectrofotómetro Epoch (BioTek) UV-Vis para microplacas a  $\lambda = 760$  nm. Las determinaciones de cada muestra se realizaron por triplicado<sup>41</sup>.

#### **4.6. Determinación del contenido de peróxido de hidrógeno<sup>42</sup>.**

Se cuantificó el contenido de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) utilizando el kit de Peróxido de hidrógeno/Peroxidasa, Amplex™ Red (ThermoFisher Scientific). El reactivo Amplex® red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxacina) reacciona con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una estequiometría 1:1 en presencia de peroxidasa para producir el producto rojo-

fluorescente de oxidación, resourfina (Figura 7). La resourfina tiene una longitud de onda de excitación y emisión máxima aproximada de 571 nm y 585 nm, respectivamente. Esta reacción tiene una sensibilidad de detección de hasta 10 picomoles de  $H_2O_2$  en un volumen de 100  $\mu L$  o  $1 \times 10^{-5}$  U/mL de HRP (peroxidasa de rábano picante).



**Figura 7.** Reacción entre reactivo Amplex® red y  $H_2O_2$  en presencia de peroxidasa<sup>42</sup>.

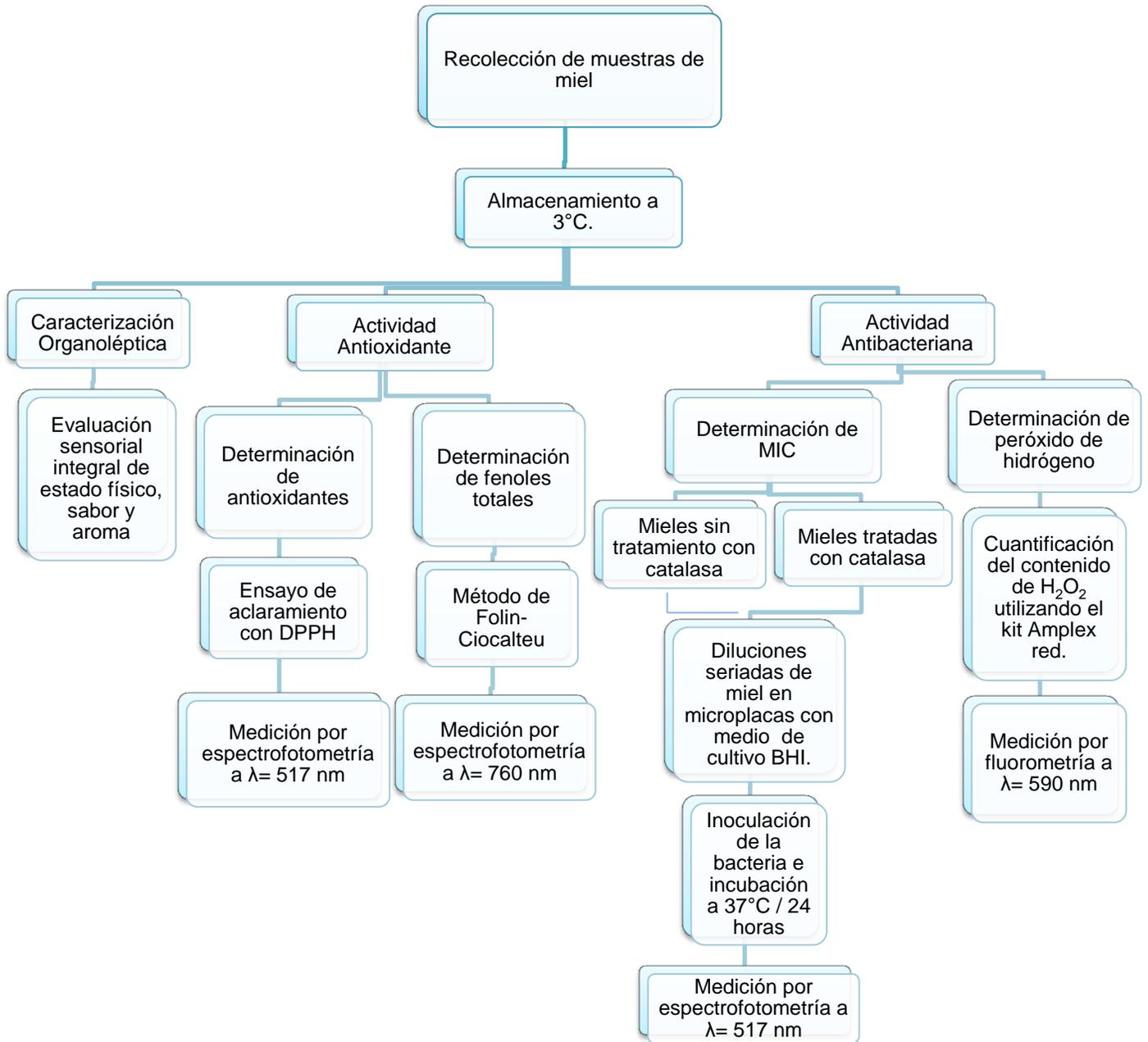
La curva de calibración se realizó utilizando como estándar una solución al ~3%  $H_2O_2$  contenida en el kit (Amplex red hydrogen peroxide/peroxidase assay kit), se realizaron diluciones a partir de una solución stock a 20 mM y el rango de concentraciones fue de 0.078  $\mu M$  a 10  $\mu M$ . Se colocaron 50  $\mu L$  de cada una de las concentraciones de muestra en una placa de 96 pozos y posteriormente se adicionaron 50  $\mu L$  de una solución de trabajo que se realizó con 50  $\mu L$  de reactivo Amplex® Red 10 mM, 100  $\mu L$  de HRP y 4.85 mL de buffer de fosfato de sodio 0.25 M, pH 7.4. Para determinar el contenido de peróxido en las muestras, primero se realizó una dilución de 1:2 con la cual se obtuvieron las muestras en estado líquido y posteriormente de 1:100 para ajustar la cantidad de peróxido de hidrógeno en las muestras a la curva de calibración. Se colocaron 50  $\mu L$  de las muestras en dilución en la placa de 96 pozos y se les adicionó 50  $\mu L$  de la

solución de trabajo. Se incubó la placa a temperatura ambiente, durante 30 minutos y protegida de la luz. Se realizaron las determinaciones en un lector de microplacas de fluorescencia (BioTek) a una longitud de onda de excitación de  $\lambda=530$  nm y a una longitud de onda de emisión de fluorescencia de  $\lambda=590$  nm, cada muestra por triplicado.

#### **4.7. Determinación de la mínima concentración inhibitoria posterior al tratamiento de las mieles con catalasa.**

Se midió la MIC de las muestras de miel tratadas con un exceso molar de catalasa de hígado de bovino, polvo liofilizado ( $2000-4000 \text{ U} \cdot (\text{mg proteína})^{-1}$ , Sigma-Aldrich C9322) para remover todo el peróxido de hidrógeno en ellas. La determinación se realizó siguiendo la metodología descrita por Brudzynski y colaboradores (2006) con modificaciones. Se realizaron diluciones 1:2 de miel con un buffer de fosfatos 50 mM de pH 7 y se incubó cada muestra con  $2000 \text{ U} \cdot \text{mL}$  de catalasa por cada  $100 \mu\text{L}$  de miel al 50% por 2 horas<sup>43</sup>. Se utilizaron microplacas estériles de 96 pozos y se realizaron diluciones seriadas para evaluar las muestras de miel tratadas a distintas concentraciones (25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78%) sobre el desarrollo bacteriano de *S. Typhimurim*, *B.cereus*, *L. monocytogenes*, *S. dysenteriae*, *E. coli* ETEC, *E. coli* EPEC y *E.coli* resistente a ampicilina, como medio de cultivo se utilizó caldo BHI. Las bacterias se ajustaron a  $0.5 (1 \times 10^6 \text{ UFC/mL})$  en la escala de Mc Farland y se inocularon todas las diluciones con  $20 \mu\text{L}$  de cultivo. Se incubó la microplaca a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas. El ensayo se realizó con las muestras que se observaron activas previamente en el ensayo de MIC ( $M_0, M_1, M_4, M_6, M_7, M_8, M_{11}, M_{14}, M_{20}, M_{21}, M_{23}, M_{24}, M_{25}$ ). La actividad se probó cuando no se observó turbidez en el medio en al menos una de las concentraciones probadas. Cada muestra de miel se probó por duplicado.

En la Figura 8 se resume la metodología que se llevó a cabo para la determinación de los resultados de todas las pruebas realizadas.



**Figura 8.** Diagrama de procedimiento experimental

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Caracterización organoléptica.

En el Cuadro 2 se describe el rango de colores de las muestras de miel recolectadas. Los colores variaron desde ámbar claro hasta café oscuro. Se observó homogeneidad en el color de todas las muestras. Por otra parte, respecto al aroma y al sabor de las muestras destacaron las de San Juan Ixtayopa (M<sub>9</sub>) y Veracruz (M<sub>10</sub>) con aromas de eucalipto y naranja, respectivamente, lo cual podría indicar un origen monofloral, debido a que las mieles monoflorales tienen sabor y aroma característicos de su procedencia botánica. Otras muestras tuvieron notas menos marcadas en olor y sabor a nuez (M<sub>3</sub>), o papa dulce (M<sub>6</sub>). No se detectaron aromas o sabores extraños en la mayor parte de las muestras; sin embargo en la muestra M<sub>1</sub> se detectó un sabor metálico y en la muestra M<sub>5</sub> un aroma metálico, Sanchis Zapater y colaboradores lo describen en su artículo acerca de mieles de espliego y de tomillo y lo atribuyen a la presencia de hexanol, un compuesto volátil encontrado en miel de espliego<sup>44</sup>. Las mieles de abeja *Melipona* (M<sub>0</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub>), se caracterizaron por tener un ligero aroma y sabor de miel en proceso de fermentación (ácido, avinagrado); por otra parte las mieles de abeja *S. mexicana* (M<sub>24</sub>, M<sub>25</sub>), se caracterizaron por aromas y sabores cítricos. Todas las muestras de abejas de la tribu *Meliponini* tuvieron un menor poder edulcorante que las muestras de abeja *A. mellifera*.

Las muestras también se clasificaron por su estado físico, en muchas de las muestras provenientes de *A. mellifera* se observó cristalización, lo cual es un fenómeno natural en la miel, ya que es una solución sobresaturada de diferentes azúcares que alcanza el equilibrio cristalizando. En las muestras con viscosidad media o alta no se presentó cristalización debido a que la migración de los cristales formados de glucosa es muy lenta<sup>23</sup>. Las muestras provenientes de abeja *Melipona*, tienen una mayor fluidez, ya que su contenido de agua es alrededor del 24%<sup>45</sup> mientras que la miel proveniente de *A. mellifera* está por debajo de 18.5%, por lo tanto la miel melipona no se encuentra cristalizada<sup>5</sup>.

**Cuadro 2.** Caracterización organoléptica de las muestras de miel con diferente procedencia de la República Mexicana.

MUESTRA	ORIGEN*	ESTADO FÍSICO/APARIENCIA	COLOR	AROMA	SABOR
M0	<i>Melipona</i> <sup>e</sup> / Cuetzalán, Puebla <sup>sc</sup>	Líquida, viscosidad baja	Ámbar claro	Dulce, ácido acético	Dulce, notas ácidas, fermentación
M1	<i>Melipona</i> <sup>e</sup> / Coatepec, Veracruz <sup>sc</sup>	Líquida, viscosidad media	Ámbar oscuro	Característico con notas de humo	Dulce, notas metálicas, fermentación
M2	Veracruz <sup>sc</sup>	Sólida por cristalización	Blanco	Característico	Dulce característico
M3	<i>Melipona</i> <sup>e</sup> / Villahermosa, Tabasco <sup>sc</sup>	Líquida con sólidos color café y negro	Ámbar, traslúcido	Dulce con notas de nuez	Dulce, ácido, notas de nuez
M4	<i>Melipona</i> <sup>e</sup> / Villahermosa, Tabasco <sup>sc</sup>	Líquida, filtrada	Ámbar traslúcido	Dulce con notas de nuez	Dulce, ácido
M5	<i>Melipona</i> <sup>e</sup> / Villahermosa, Tabasco <sup>sc</sup>	Líquida, sin impurezas, calentada a 60°C	Ámbar traslúcido	Dulce con notas de nuez, metálico	Dulce, característico
M6	San Pablo Oztotepec, Cd. de México <sup>sc</sup>	Sólida por cristalización	Ámbar	Característico	Dulce, notas de papa dulce
M7	Acuexcomatl, Cd. de México <sup>sc</sup>	Líquida, viscosidad alta	Ámbar oscuro	Característico herbal	Dulce, característico
M8	Chihuahua <sup>sc</sup> / Aguacate <sup>pm</sup>	Líquida, viscosidad muy alta	Café oscuro	Característico con notas ácidas	Dulce, característico
M9	San Juan Ixtayopan, Cd. de México <sup>sc</sup> / Eucalipto <sup>pm</sup>	Parcialmente sólida por cristalización	Ámbar	Característico	Dulce, notas de eucalipto
M10	Veracruz <sup>sc</sup> / Naranja <sup>pm</sup>	Parcialmente sólida por cristalización	Ámbar	Característico	Dulce, notas de naranja

\* especie= <sup>e</sup>

sitio de colecta= <sup>sc</sup>

planta melífera principal= <sup>pm</sup>

**Cuadro 2.** Caracterización organoléptica de las muestras de miel con diferente procedencia de la República Mexicana (*continuación*).

MUESTRA	ORIGEN*	ESTADO FÍSICO/APARIENCIA	COLOR	AROMA	SABOR
M11	Acuexcomatl, Cd. de México <sup>sc</sup>	Líquida, viscosidad media, dos fases (turbia y transparente)	Ámbar	Característico	Dulce, notas de anís
M12	Acuexcomatl, Cd. de México <sup>sc</sup>	Sólida por cristalización, seco	Blanco amarillento	Característico	Dulce característico
M13	San Miguel Topilejo, Cd. de México <sup>sc</sup>	Sólida por cristalización	Ámbar claro	Dulce, ligeramente fermentado	Dulce característico, fermentado
M14	Coatepec, Veracruz <sup>sc</sup>	Parcialmente sólida por cristalización	Ámbar oscuro	Dulce, notas de maguey	Dulce, ácido
M15	Zacatecas <sup>sc</sup> / Mezquite <sup>pm</sup>	Líquida, viscosidad media	Ámbar	Dulce, notas de leche	Dulce, fermentación
M16	Hidalgo <sup>sc</sup>	Líquida, viscosidad media	Ámbar	Característico	Característico
M17	Sierra de S.L.P. <sup>sc</sup>	Líquida, viscosidad media	Ámbar	Característico	Característico
M18	<i>Melipona</i> comercial <sup>e</sup>	Líquida, viscosidad muy alta	Ámbar	Fermentación	Característico amargo
M19	Ciudad Valles, S.L.P. <sup>sc</sup>	Líquida, viscosidad media	Ámbar oscuro	Característico	Característico
M20	Michoacán <sup>sc</sup> / Aguacate <sup>pm</sup>	Líquida, viscosidad alta	Café muy oscuro	Característico	Característico
M21	Veracruz <sup>sc</sup> / Naranja <sup>pm</sup>	Parcialmente sólida por cristalización	Ámbar	Característico	Dulce, cítrico

\* especie= <sup>e</sup>

sitio de colecta= <sup>sc</sup>

planta melífera principal= <sup>pm</sup>

**Cuadro 2.** Caracterización organoléptica de las muestras de miel con diferente procedencia de la República Mexicana (*continuación*).

MUESTRA	ORIGEN*	ESTADO FÍSICO/APARIENCIA	COLOR	AROMA	SABOR
M22	Chontalpa, Tabasco <sup>sc</sup>	Parcialmente sólida por cristalización	Ámbar oscuro	Característico	Característico
M23	Ciudad Valles, S.L.P. <sup>sc</sup>	Parcialmente sólida por cristalización	Ámbar claro	Característico	Característico
M24	<i>Scaptotrigona mexicana</i> <sup>e/</sup> Cuetzalán, Puebla <sup>sc</sup>	Líquida, viscosidad muy baja	Ámbar	Cítrico	Cítrico
M25	<i>Scaptotrigona mexicana</i> <sup>e/</sup> Cuetzalán, Puebla <sup>sc</sup>	Líquida, viscosidad muy baja	Ámbar claro	Característico con notas cítricas	Cítrico

\* especie= <sup>e</sup>  
 sitio de colecta= <sup>sc</sup>  
 planta melífera principal= <sup>pm</sup>

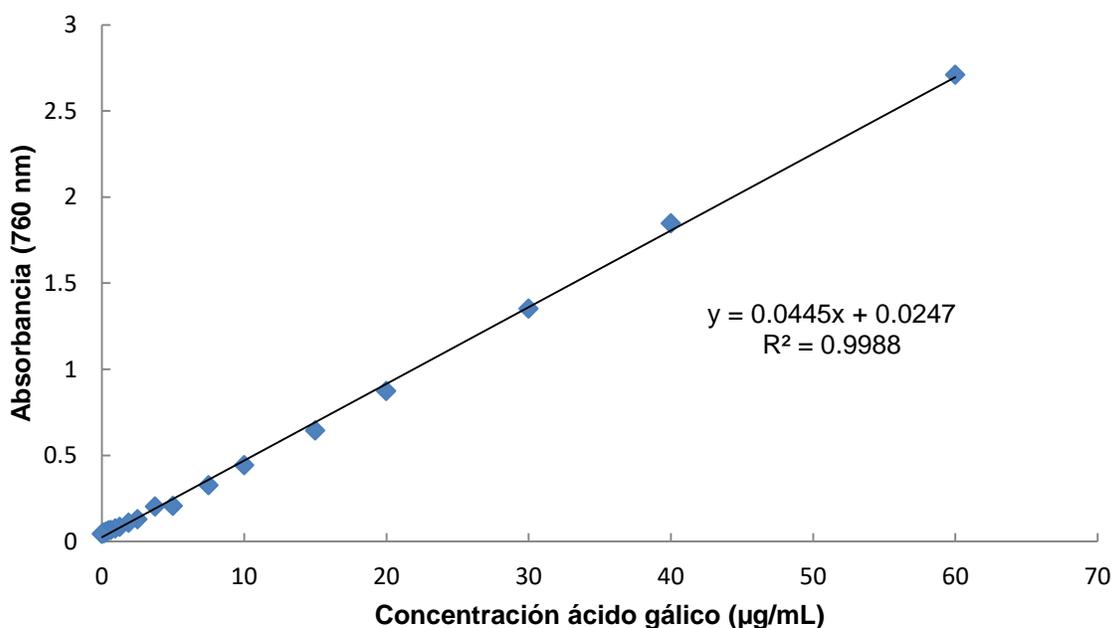
De acuerdo con la norma mexicana NMX-F-036-981, el color de la miel para comercialización debe ser el característico y variar sólo en la tonalidad de ámbar, que es la coloración aceptable. En el caso de las mieles de prueba, sólo las mieles M<sub>8</sub> y M<sub>20</sub> salieron del rango de tonalidades características, al ser muy oscuras. De acuerdo a la Comisión del Codex Alimentarius el color de la miel varía de casi sin color a café oscuro, por lo que todas las muestras entran en esta especificación. En cuanto al aroma y sabor, la norma indica que deben ser característicos sin sabores ni olores extraños o con índice de fermentación; por lo que se rechazarían las muestras M<sub>0</sub> y M<sub>13</sub> que presentaron aroma y sabor que indican el comienzo del proceso de fermentación, la muestra M<sub>18</sub> que presentó únicamente aroma a fermentación y las muestras M<sub>1</sub> y M<sub>15</sub> que tuvieron un sabor a miel en proceso de fermentación<sup>14</sup>. Las muestras de miel de abeja melipona son más susceptibles a la fermentación y al cambio en sus propiedades sensoriales y fisicoquímicas debido

a que su composición contiene mayor porcentaje de agua, cambio favorecido por condiciones inadecuadas de almacenamiento.

## 5.2. Determinación del contenido de fenoles totales.

Los compuestos polifenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos) en la miel varían dependiendo del origen floral y geográfico, así como características climáticas del lugar. Su interés radica en su gran capacidad antioxidante.

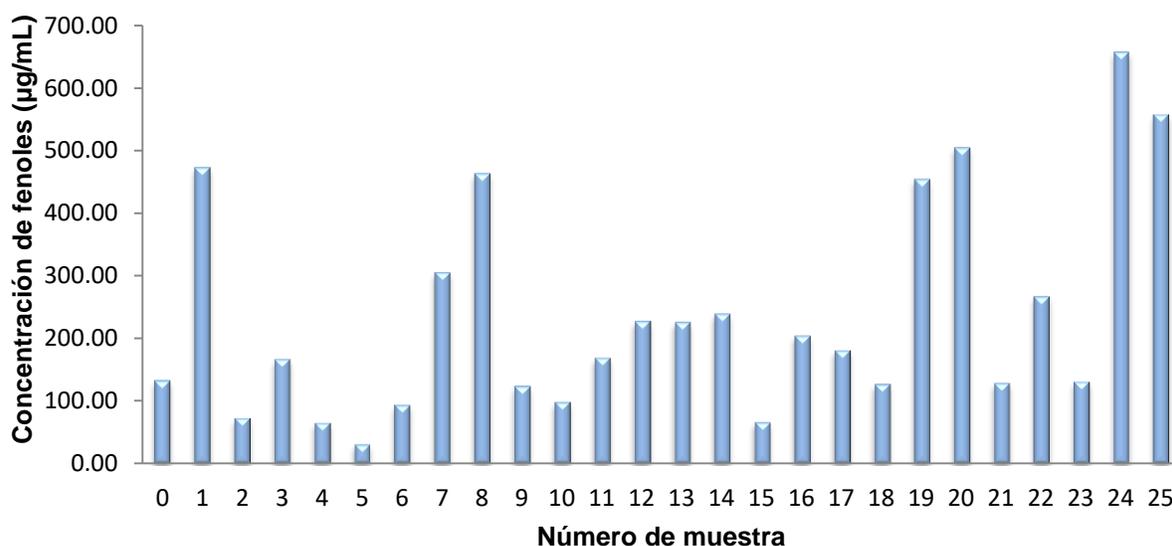
Para la determinación de la concentración de fenoles totales en las muestras, se realizó una curva de calibración mostrada en la Gráfica 1. La curva final obtuvo un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.9988, lo cual indica una buena correlación en la curva y por lo tanto mayor exactitud en la interpolación de la absorbancia para obtener la concentración de compuestos fenólicos totales en las muestras de miel.



**Gráfica 1.** Curva de calibración de fenoles totales

Con los datos de la curva de calibración fue posible determinar el rango de concentraciones en las muestras. Se tuvo un rango entre 30.98  $\mu\text{g/mL}$  y 657.82  $\mu\text{g/mL}$  como se representa en la Gráfica 2. La muestra  $M_{24}$  presentó el mayor

contenido fenólico con 657.82  $\mu\text{g/mL}$ , seguida de las muestras  $M_{25}$ ,  $M_{20}$  y  $M_1$  con 557.76  $\mu\text{g/mL}$ , 504.61  $\mu\text{g/mL}$  y 473.26  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Las muestras con menor contenido de fenoles totales fueron las muestras  $M_5$ ,  $M_4$  y  $M_{15}$  con un contenido total de 30.98  $\mu\text{g/mL}$ , 65.85  $\mu\text{g/mL}$  y 66.46  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.



**Gráfica 2.** Resultados del ensayo para la cuantificación de fenoles totales en las muestras de miel

Derivado de lo anterior, se observa que las dos muestras que obtuvieron mayor concentración total de fenoles fueron  $M_{24}$  y  $M_{25}$ , ambas obtenidas de la especie sin aguijón *S. mexicana*, de la región de Cuetzalán, Puebla. La tercera y la quinta muestra con mayor concentración de fenoles totales fueron  $M_{20}$  y  $M_8$  respectivamente, es importante destacar que ambas muestras tienen posiblemente el mismo origen botánico y que tienen una tonalidad más oscura que el resto de las muestras, propiedad característica en mieles provenientes del néctar de la flor de aguacate; sin embargo, la muestra  $M_{20}$  presenta una coloración

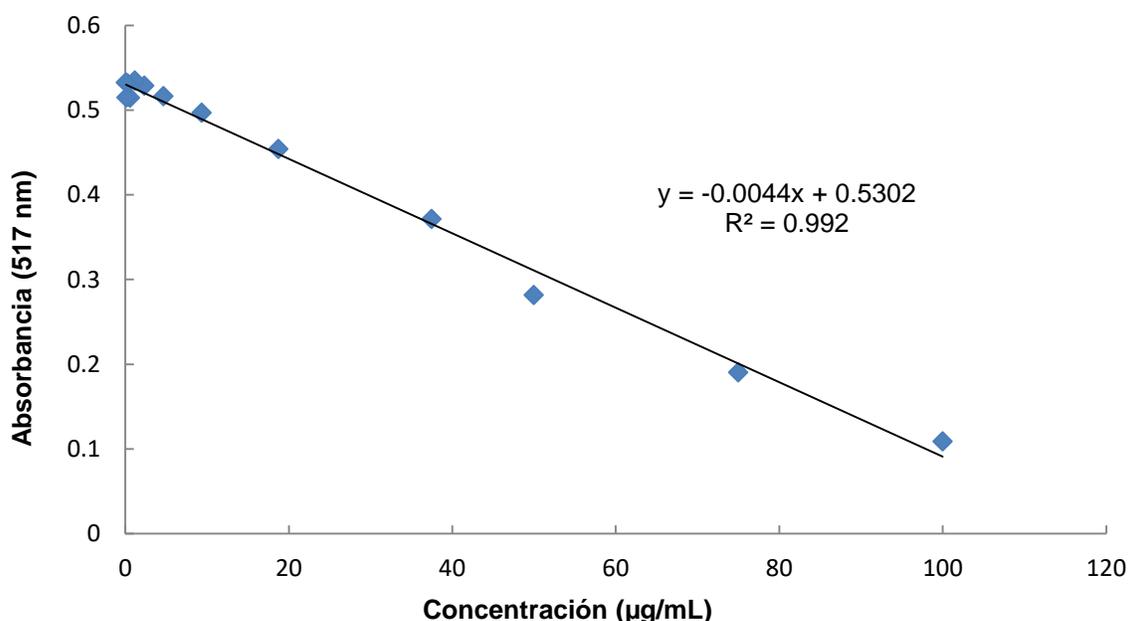
mucho más oscura. De acuerdo a Afik O. y colaboradores (2006) en su artículo sobre el análisis del néctar de la flor de aguacate, un mayor contenido de minerales y compuestos fenólicos en miel corresponden a tonalidades más oscuras en el espectro visible y ultravioleta, cabe mencionar que ambos espectros son visibles para las abejas<sup>46</sup>. La cuarta muestra con mayor contenido fenólico (M<sub>1</sub>) proviene de abeja del género *Melipona* spp. de la región de Coatepec en Veracruz.

Por otro lado, las muestras con menor contenido de compuestos fenólicos totales fueron las muestras M<sub>5</sub> y M<sub>4</sub> provenientes de la misma miel de abeja *Melipona* spp. con un tratamiento previo de calentamiento y filtración, respectivamente. De acuerdo a Pyrzynska y colaboradores (2009), los compuestos fenólicos son susceptibles a la degradación térmica a temperaturas mayores a 40°C<sup>47</sup>. Sin embargo la visible disminución de compuestos fenólicos entre la muestra M<sub>4</sub> y M<sub>3</sub> (miel sin tratamiento), no puede ser atribuida al proceso de filtración comercial que se hace a 100 µm, ya que los compuestos fenólicos tienen un tamaño molecular menor, pero si puede ser atribuida al proceso de separación mecánica de cera y miel en centrifugas que de no tener un controlador de temperatura pueden incrementar la temperatura de la miel y afectar su composición<sup>15</sup>.

Dentro de los compuestos fenólicos, los flavonoides se comportan como antioxidantes en diferentes maneras: al ser secuestrantes de especies reactivas de oxígeno, inhibiendo enzimas, quelando metales de transición involucrados en formación de radicales libres y en la prevención del proceso de formación de peróxido al reducir los radicales alcoxil y peroxil. Su actividad recae en el número y posición de grupos hidroxilo, sustituyentes adicionales, así como de la glicosilación de las moléculas del flavonoide<sup>26</sup>.

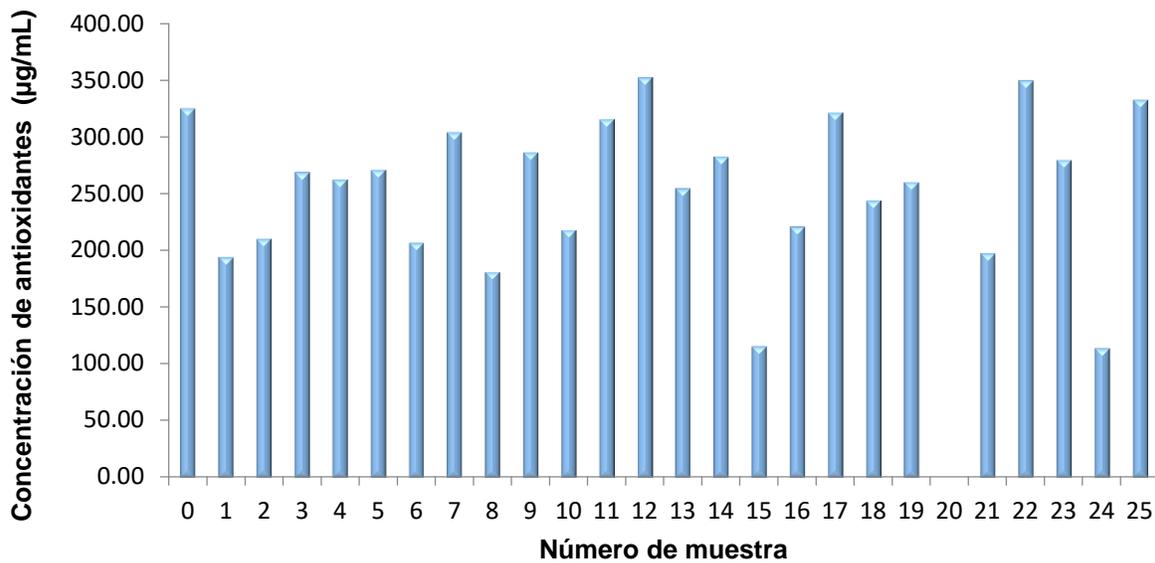
### 5.3 Determinación del contenido antioxidante.

Se realizó una curva de calibración (Gráfica 3) con el fin de interpolar la absorbancia de cada muestra y así obtener la concentración total de antioxidantes en las mieles. La curva de calibración obtuvo un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.992, lo cual indica una correlación aceptable para interpolar las absorbancias de las muestras y obtener resultados con exactitud. El rango de concentración en las muestras se ubicó entre 65.43  $\mu\text{g/mL}$  y 352.49  $\mu\text{g/mL}$ .



**Gráfica 3.** Curva de calibración de concentración de antioxidantes

En el Gráfica 4 se muestran los resultados de la concentración de antioxidantes de las mieles. La muestra con mayor contenido en antioxidantes fue la muestra  $M_{12}$  con 352.49  $\mu\text{g/mL}$ , seguida de la muestra  $M_{22}$  con 349.77  $\mu\text{g/mL}$  y la muestra  $M_{25}$  con 332.88  $\mu\text{g/mL}$ . No se obtuvo una medición correcta de la absorbancia de la muestra  $M_{20}$  debido a que su color tan oscuro causó interferencia. La muestra  $M_{24}$ , seguida de la muestras  $M_{15}$  y  $M_8$  obtuvieron las menores concentraciones con 114.01  $\mu\text{g/mL}$ , 115.52  $\mu\text{g/mL}$  y 180.98  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.



**Gráfica 4.** Resultados del ensayo para la cuantificación de antioxidantes totales en las muestras miel

La muestra con mayor concentración total de antioxidante, M<sub>12</sub>, tiene un origen botánico multifloral, y proviene del sur de la Ciudad de México, del centro educativo “Acuexcomatl”. De acuerdo con Bertonecelj, Jasna y colaboradores (2007) en su artículo sobre la evaluación del contenido fenólico, actividad antioxidante y color en muestras de miel de Eslovenia, el factor con mayor influencia en la actividad antioxidante es el origen botánico<sup>48</sup>. En la muestra M<sub>22</sub> se observó la segunda mayor actividad antioxidante, esta miel proviene de Tabasco de la subregión de Chontalpa, donde se ha caracterizado como flora melífera al cocotero (*Cocos nucifera*), cuyo fruto es el coco, al palo mulato (*Bursera simaruba*), árbol de características xerófitas y al guayabo (*Psidium guajava*), esta caracterización es un buen pronóstico del perfil botánico del cual provino la miel, y permite concluir que este perfil aporta un alto contenido en antioxidantes totales<sup>3</sup>. En tercer lugar se posicionó la muestra M<sub>25</sub>, cuyo origen geográfico es la región de Cuetzalan, Puebla. El perfil de la flora melífera de dicha región se caracteriza

principalmente por las especies: *Citrus sinensis* (naranja), *Coffea arabica* (café), *Pimenta dioica* (pimienta) y *Citrus aurantifolia* (limonero)<sup>49</sup>. Se sabe que los cítricos contienen alto contenido en antioxidantes totales encontrados en la totalidad de la planta, Hyang-Sook Choi y colaboradores (2000) establecen un contenido máximo de 170 mg equivalentes de Trolox/mL en *C. aurantifolia*<sup>50</sup>. Es importante mencionar que esta muestra proviene de la especie *S. mexicana*, abeja sin agujón.

Por otra parte, las muestras con menor contenido antioxidante M<sub>24</sub> y M<sub>15</sub>, indican una baja actividad antioxidante del néctar de la flora de origen. Sin embargo, surge una contradicción en el hecho de que la muestra M<sub>25</sub>, obtuvo una alta actividad antioxidante siendo del mismo origen que la muestra M<sub>24</sub>, esto puede ser ocasionado por provenir de diferentes cosechas, debido a que factores ambientales como la temperatura, la cantidad de luz solar y las lluvias modifican la composición de la flora melífera. La muestra M<sub>15</sub> proviene del mezquite (árbol caducifolio de leguminosas), se cree que su actividad antioxidante no debe ser muy alta debido a que no se ha reportado un alto contenido en antioxidantes totales en la literatura<sup>51</sup>.

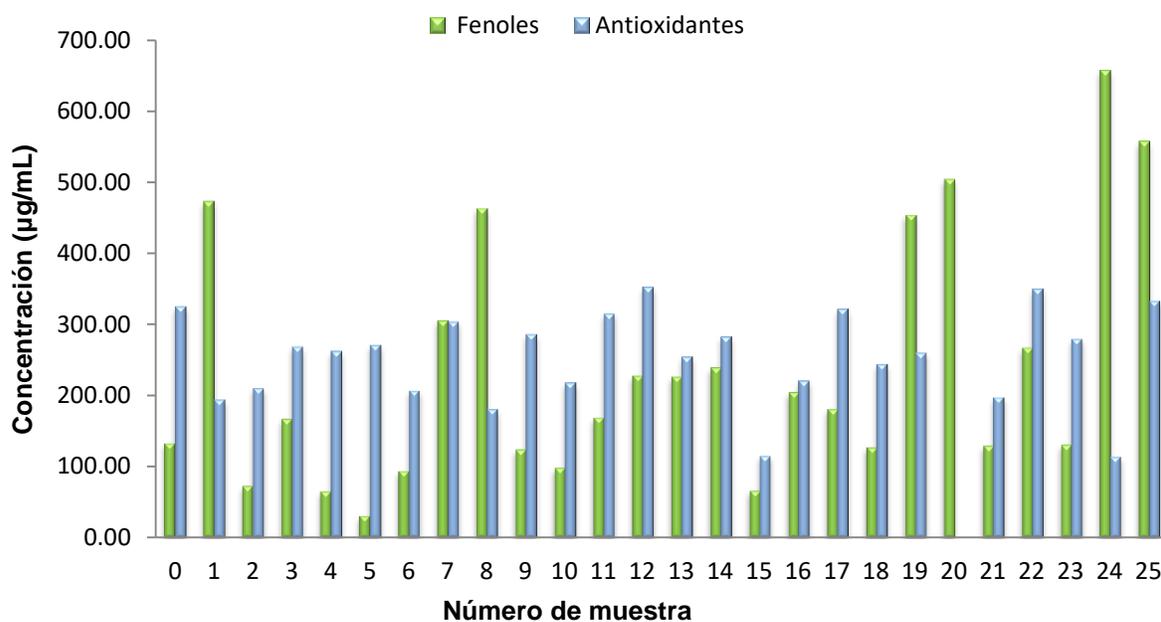
La miel representada por las muestras M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> y M<sub>5</sub>, mostró una concentración de antioxidantes ligeramente menor después del tratamiento de filtración (M<sub>4</sub>) lo cual está posiblemente relacionado a la disminución en ciertos compuestos fenólicos con actividad antioxidante. Por otro lado, la miel después del calentamiento a 60°C (M<sub>6</sub>) mostró un ligero incremento en la concentración de antioxidantes, esto se ha fundamentado en la literatura en la generación de ciertos compuestos derivados de reacciones de oscurecimiento no enzimático, que forman pigmentos pardos con potencial antioxidante y también en la formación de compuestos con diferente actividad antioxidante en varias etapas de la reacción de Maillard dependientes de las temperaturas a las que se someta la miel, conforme aumenta la temperatura incrementa la formación de estos compuestos<sup>34</sup>.

Como se mencionó anteriormente, existe cierta relación entre la capacidad antioxidante y el contenido total de compuestos fenólicos en la miel, esto se debe

a que ciertos compuestos fenólicos, incluidos los flavonoides, tienen alto potencial antioxidante. Sin embargo, en el ensayo se observó que las muestras con la mayor concentración de antioxidantes no fueron las mismas muestras con alto contenido en compuestos fenólicos o flavonoides. Se ha reportado que los compuestos fenólicos en mieles de colores oscuros tienen una mayor actividad antioxidante que los compuestos fenólicos de las de colores claros. En el estudio conducido por Chang y colaboradores (2011) la tendencia de mieles de color oscuro a tener mayor potencial antioxidante se demuestra claramente en los resultados obtenidos; sin embargo en el presente estudio las mieles más oscuras, representadas por las muestras M<sub>1</sub>, M<sub>7</sub> M<sub>8</sub>, M<sub>14</sub>, M<sub>20</sub>, no demostraron esa misma tendencia. Lo anterior se puede fundamentar en el potencial antioxidante de otras sustancias encontradas en la miel, como ácidos orgánicos, productos de la reacción de Maillard, enzimas, péptidos entre otros componentes minoritarios que posiblemente contribuyeron en el potencial de las muestras de colores claros con alta actividad antioxidante como lo es la muestra M<sub>12</sub>, muestra con la mayor actividad antioxidante<sup>52</sup>.

Otawa y colaboradores (2001) reportan en su estudio acerca del potencial antioxidante que existen ciertos compuestos fenólicos con mayor actividad que otros, por ejemplo la quercetina, que es un excelente antioxidante a diferencia de la isovitexina y saponarina, (pertenecientes al grupo de los flavonoides por ser flavonas) que demostraron nula y poca actividad, respectivamente. Esta variación en la actividad antioxidante radica principalmente en la cantidad y posición de los grupos OH. Las principales características estructurales que proporcionan actividad antioxidante efectiva se resumen en una estructura orto-dihidroxil en el anillo B, un doble enlace en posición 2,3 en conjugación con un arreglo 4-oxo en el anillo C y grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 para proporcionar enlaces de hidrógeno. Por esta razón la quercetina, del grupo de los flavonoles, al tener un grupo 3,5,7,3',4'- pentrahidroxilo tiene una fuerte actividad antioxidante<sup>53,54</sup>. Por lo tanto, se debe conocer la estructura y posición de los grupos OH en los fenoles de cada muestra de miel, para poder predecir su actividad antioxidante. En la Gráfica 5 se muestra la comparación entre el contenido de fenoles y antioxidantes totales

de todas las muestras y se observa que la muestra M<sub>7</sub> fue la que obtuvo mejor correlación entre las dos determinaciones y las muestras M<sub>5</sub>, M<sub>4</sub>, M<sub>0</sub> y M<sub>9</sub> fueron muestras con alto contenido en antioxidantes en comparación con su contenido fenólico lo cual puede deberse a una alta capacidad antioxidante de sus compuestos fenólicos y/o de otros compuestos con alta actividad antioxidante. Para la muestra M<sub>20</sub> no se logró cuantificar concentración de antioxidantes debido a la probable interferencia de la absorbancia a las longitudes de onda de dichos ensayos, a causa de su color tan oscuro. Por otra parte, las muestras M<sub>1</sub>, M<sub>8</sub>, M<sub>24</sub> y M<sub>25</sub> obtuvieron altas concentraciones en fenoles totales y bajas en antioxidantes totales, lo cual indica una baja capacidad antioxidante de sus compuestos fenólicos.



**Gráfica 5.** Comparación entre el contenido de antioxidantes y fenoles totales en las muestras de miel

#### 5.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de las mieles sin tratar y tratadas con catalasa sobre el crecimiento de bacterias patógenas.

Con el fin de evaluar la actividad antibacteriana se realizó la determinación de la concentración mínima inhibitoria de cada muestra de miel en dilución y tratada con catalasa con el fin de remover el peróxido de hidrógeno. Este ensayo se determinó utilizando siete cepas bacterianas. A continuación se resumen los resultados para las mieles sin tratar y tratadas con catalasa.

En el Cuadro 3 se muestran los resultados de las mieles activas ante *L. monocytogenes*, se observó actividad en nueve muestras en un rango de 6.25% a 25% de concentración, la mayor actividad fue demostrada por las muestras M<sub>0</sub>, M<sub>1</sub> y M<sub>8</sub>.

**Cuadro 3.** Resultados de MIC de las muestras activas probadas sobre *Listeria monocytogenes* (clave CFQ 103).

Muestra	MIC (%) mieles sin tratamiento con catalasa	MIC (%) mieles tratadas con catalasa
M <sub>0</sub>	6.25	N.A.
M <sub>1</sub>	6.25	N.A.
M <sub>3</sub>	12.5	N.P.
M <sub>7</sub>	12.5	N.A.
M <sub>8</sub>	6.25	N.A.
M <sub>11</sub>	25	N.A.
M <sub>14</sub>	12.5	N.A.
M <sub>20</sub>	12.5	N.A.
M <sub>22</sub>	12.5	N.A.

N.A.= No activa    N.P.=No probada

En el Cuadro 4 se resumen los resultados de las mieles activas ante *S. Typhimurium*, se observó actividad en un rango de concentración de 12.5% a 25% en seis mieles, la mayor actividad fue presentada por las muestras M<sub>0</sub>, M<sub>1</sub> y M<sub>11</sub>.

**Cuadro 4.** Resultados de MIC de las muestras activas probadas sobre *Salmonella enterica* Typhimurium (cepa 14028).

<b>Muestra</b>	<b>MIC (%) mieles sin tratamiento con catalasa</b>	<b>MIC (%) mieles tratadas con catalasa</b>
M <sub>0</sub>	12.5	N.A.
M <sub>1</sub>	12.5	N.A.
M <sub>7</sub>	25	N.A.
M <sub>8</sub>	25	N.A.
M <sub>11</sub>	12.5	N.A.
M <sub>20</sub>	25	N.A.

En el Cuadro 5 se muestra la MIC probada ante la bacteria *B. cereus*, se observó actividad en ocho muestras en un rango de concentración de 6.25% a 25% la máxima actividad mostrada por la muestra M<sub>1</sub> a 6.25% y por las muestras M<sub>0</sub> y M<sub>3</sub> a 12.5%.

**Cuadro 5.** Resultados de MIC de las muestras activas probadas sobre *Bacillus cereus* (cepa 11778).

<b>Muestra</b>	<b>MIC (%) mieles sin tratamiento con catalasa</b>	<b>MIC (%) mieles tratadas con catalasa</b>
M <sub>0</sub>	12.5	N.A.
M <sub>1</sub>	6.25	N.A.
M <sub>3</sub>	12.5	N.P.
M <sub>7</sub>	25	N.A.
M <sub>8</sub>	25	N.A.
M <sub>11</sub>	25	N.A.
M <sub>20</sub>	25	N.A.
M <sub>21</sub>	25	N.A.

En el Cuadro 6 se resume la actividad de las muestras ante *E. coli* EPEC en un rango de concentración de miel de 12.5% a 25%, cuatro muestras de mieles presentaron alta actividad, siendo las más activas las muestras M<sub>0</sub> y M<sub>1</sub>.

**Cuadro 6.** Resultados de MIC de las muestras activas probadas sobre *Escherichia coli* EPEC (cepa 95222).

<b>Muestra</b>	<b>MIC (%) mieles sin tratamiento con catalasa</b>	<b>MIC (%) mieles tratadas con catalasa</b>
M <sub>0</sub>	12.5	N.A.
M <sub>1</sub>	12.5	N.A.
M <sub>20</sub>	25	N.A.
M <sub>25</sub>	25	N.A.

En el Cuadro 7 se muestran los resultados de la actividad exhibida por las mieles ante la bacteria *E. coli* ETEC, cinco muestras presentaron actividad en un rango de concentración de 12.5% a 25%, siendo las más activas M<sub>0</sub> y M<sub>1</sub>.

**Cuadro 7.** Resultados de MIC de las muestras activas probadas sobre *Escherichia coli* ETEC (cepa 95238).

Muestra	MIC (%) mieles sin tratamiento con catalasa	MIC (%) mieles tratadas con catalasa
M <sub>0</sub>	12.5	N.A.
M <sub>1</sub>	12.5	N.A.
M <sub>7</sub>	25	N.A.
M <sub>8</sub>	25	N.A.
M <sub>20</sub>	25	N.A.

En el Cuadro 8 se observan los resultados obtenidos en el ensayo ante la bacteria *S. dysenteriae*, tres muestras tuvieron actividad: M<sub>0</sub> y M<sub>1</sub> a 12.5% de concentración y M<sub>20</sub> a 25%.

**Cuadro 8.** Resultados de MIC de las muestras activas probadas sobre *Shigella dysenteriae* (cepa 58a).

Muestra	MIC (%) mieles sin tratamiento con catalasa	MIC (%) mieles tratadas con catalasa
M <sub>0</sub>	12.5	N.A.
M <sub>1</sub>	12.5	N.A.
M <sub>20</sub>	25	N.A.

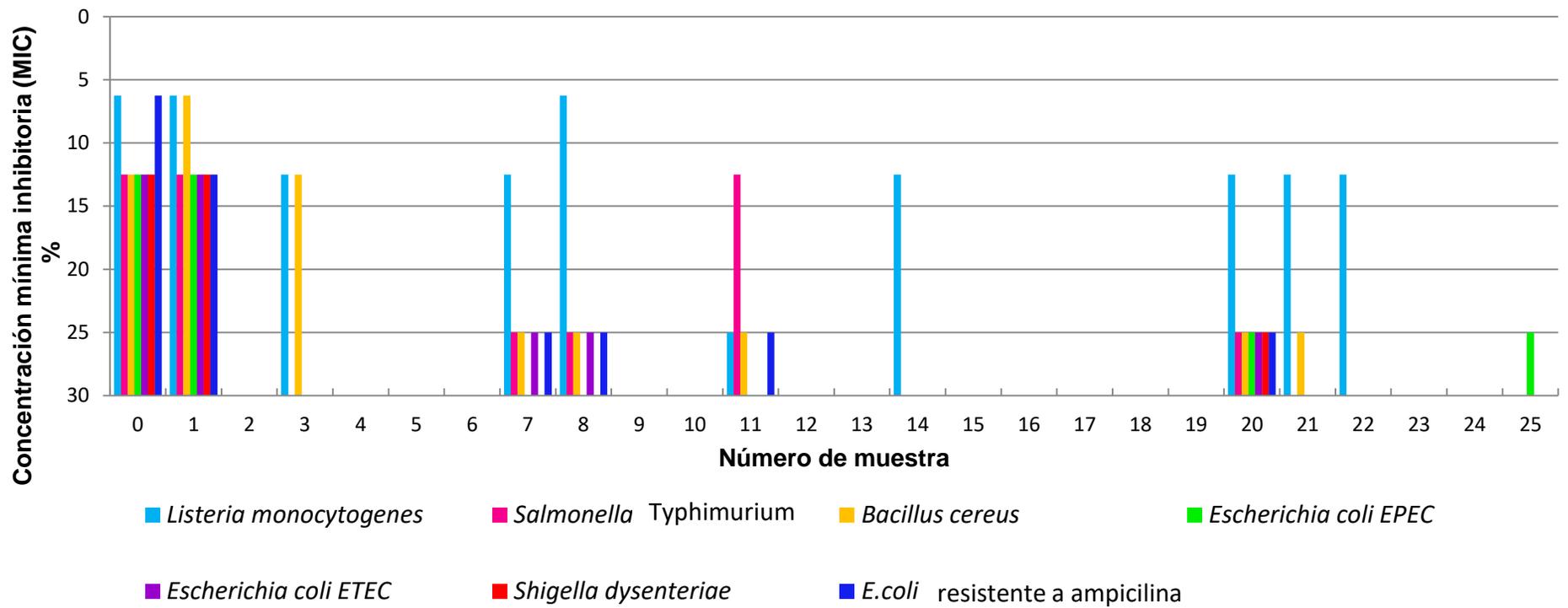
Por último, en el Cuadro 9 se resumen los resultados de la actividad probada ante *E. coli* resistente a ampicilina, seis mieles mostraron actividad en un rango de concentración de 6.25% a 25%. La mayor actividad fue mostrada por M<sub>0</sub> a 6.25% y por M<sub>1</sub> a 12.5%.

**Cuadro 9.** Resultados de MIC de las muestras activas probadas sobre *Escherichia coli* resistente a ampicilina (cepa 108412).

<b>Muestra</b>	<b>MIC (%) mieles sin tratamiento con catalasa</b>	<b>MIC (%) mieles tratadas con catalasa</b>
M <sub>0</sub>	6.25	N.A.
M <sub>1</sub>	12.5	N.A.
M <sub>7</sub>	25	N.A.
M <sub>8</sub>	25	N.A.
M <sub>11</sub>	25	N.A.
M <sub>20</sub>	25	N.A.

Las mieles tratadas con catalasa no muestran actividad alguna en ausencia de peróxido de hidrógeno. La miel M<sub>3</sub> no se probó después del tratamiento con catalasa por tener insuficiente cantidad de muestra.

En la Gráfica 6 se muestran los resultados de la MIC de todas las muestras sin tratamiento con catalasa, ya que al ser tratadas con catalasa la actividad cesó.



**Gráfica 6.** Concentración mínima inhibitoria de las muestras de miel a diferentes concentraciones sobre bacterias patógenas

Las mieles más activas fueron  $M_0$  y  $M_1$  ya que ambas inhibieron todas las cepas bacterianas a concentraciones menores a 25%, en casi todas las cepas su MIC fue de 12.5%. En el ensayo con *L. monocytogenes* las dos muestras tuvieron una MIC de 6.25%. En el ensayo sobre *B.cereus* la MIC de  $M_1$  fue 6.25% y la MIC de  $M_0$  fue de 12.5% y en el ensayo sobre *E.coli* resistente a ampicilina, la MIC de  $M_0$  fue 6.25% y la de  $M_1$  de 12.5%. Ambas muestras son de abeja *Melipona* spp. Su actividad puede ser atribuida a su contenido de peróxido de hidrógeno porque al ser tratadas con catalasa su actividad desapareció. Sin embargo, un factor importante a considerar fue la presencia de aromas y sabores que indicaban fermentación, lo cual impide el desarrollo de otros microorganismos, ya que en el proceso fermentativo se desarrollan metabolitos que impiden el crecimiento de bacteriano como etanol,  $CO_2$  y posteriormente ácido acético, además del cambio en la composición de la matriz de la miel como alimento, la falta de nutrientes consumidos por el microorganismo fermentador y la competencia creada. El principal microorganismo fermentador encontrado en la miel es la levadura *Saccharomyces* spp, pero también se han encontrado otros géneros de levadura como: *Zygosaccharomyces*, *Torulopsis*, *Pichia*, y *Rhodotorula*, entre otros.<sup>55</sup>.

Asimismo, la muestra  $M_{20}$  inhibió el desarrollo de todas las bacterias a 25% de concentración, y a 12.5% de concentración sobre *L. monocytogenes*, lo anterior se fundamenta en que ésta es una bacteria Gram positiva y la composición de su pared celular tiene mayor vulnerabilidad que la pared celular de las bacterias Gram negativas debido a que la membrana externa de las bacterias Gram negativas actúa como barrera que impide la entrada de varios agentes antibacterianos<sup>56</sup>. La actividad mostrada por esta miel también se inhibió al ser tratada con catalasa, por lo tanto su actividad se supone responsable de la concentración de peróxido de hidrógeno.

La miel  $M_8$  comparte el perfil de flora melífera principal (flor de aguacate) y de especie productora (*A. mellifera*) con la miel  $M_{20}$ , sin embargo en la miel  $M_8$  no se observó la misma actividad antibacteriana. La miel  $M_8$  no logró inhibir a las bacterias *S. dysenteriae* y *E. coli* EPEC. A pesar de esto tuvo una actividad más

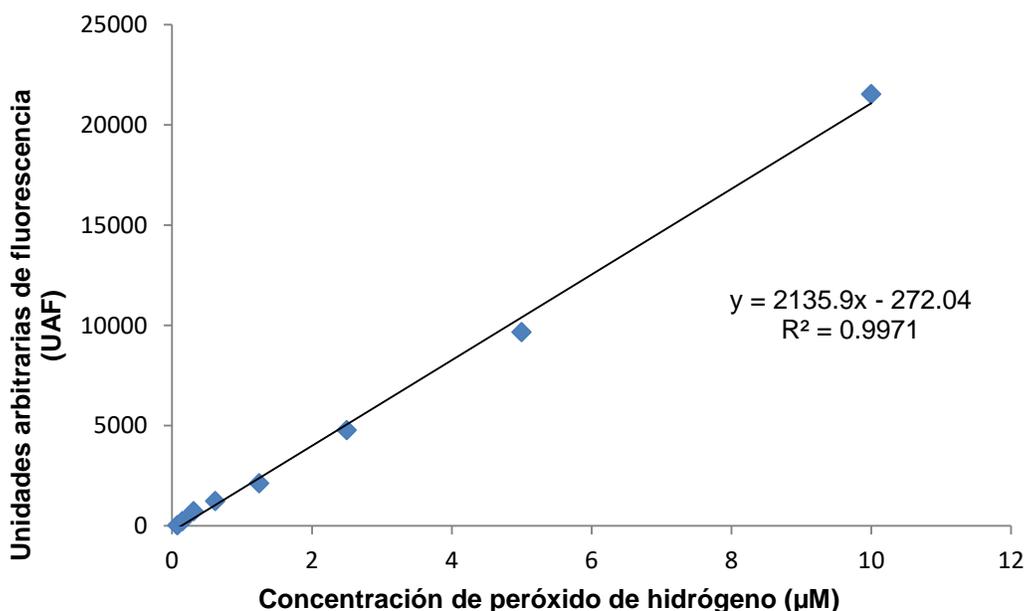
fuerte ante *L. monocytogenes* al mostrar una MIC de 6.25% a diferencia de M<sub>20</sub> cuya MIC ante *L. monocytogenes* fue de 12.5%. Lo anterior está probablemente relacionado con el mayor contenido de compuestos fenólicos en la miel M<sub>20</sub>, debido a su probada actividad antimicrobiana<sup>8</sup>. La miel M<sub>7</sub> demostró una actividad antibacteriana muy similar a la miel M<sub>8</sub>, con la única diferencia observable en la acción sobre *L. monocytogenes* que fue menor al presentar una MIC de 12.5%

Por otro lado, la muestra M<sub>21</sub> se observó activa ante *L. monocytogenes* a 12.5% y a 25% ante *B.cereus*, ambas bacterias son Gram positivas.

En la literatura se ha reportado a la miel como un potente agente inhibitorio del crecimiento de bacterias patógenas provenientes de los alimentos. Taormina y colaboradores probaron mieles monoflorales de trébol, aguacate, cárcamo y trigo a una concentración máxima de 25%; sobre *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*, encontrando inhibición de todas las cepas por todas las mieles probadas a una concentración de 25% o menor<sup>57</sup>. Por otro lado, Roberts y colaboradores describen la influencia de la miel Manuka en la supresión de los genes asociados a la presencia de flagelos bacterianos, en su artículo describe que la exposición a la miel impide la expresión de la proteína flagelina, responsable de la formación de flagelos en bacterias<sup>58</sup>. En la presente investigación se trabajó con bacterias peritricas (*S. Typhimurium*, *E. coli*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*), y con *S. dysenteriae*, que es no-móvil. Y los resultados mostraron que la bacteria más resistente a la inhibición fue ésta.

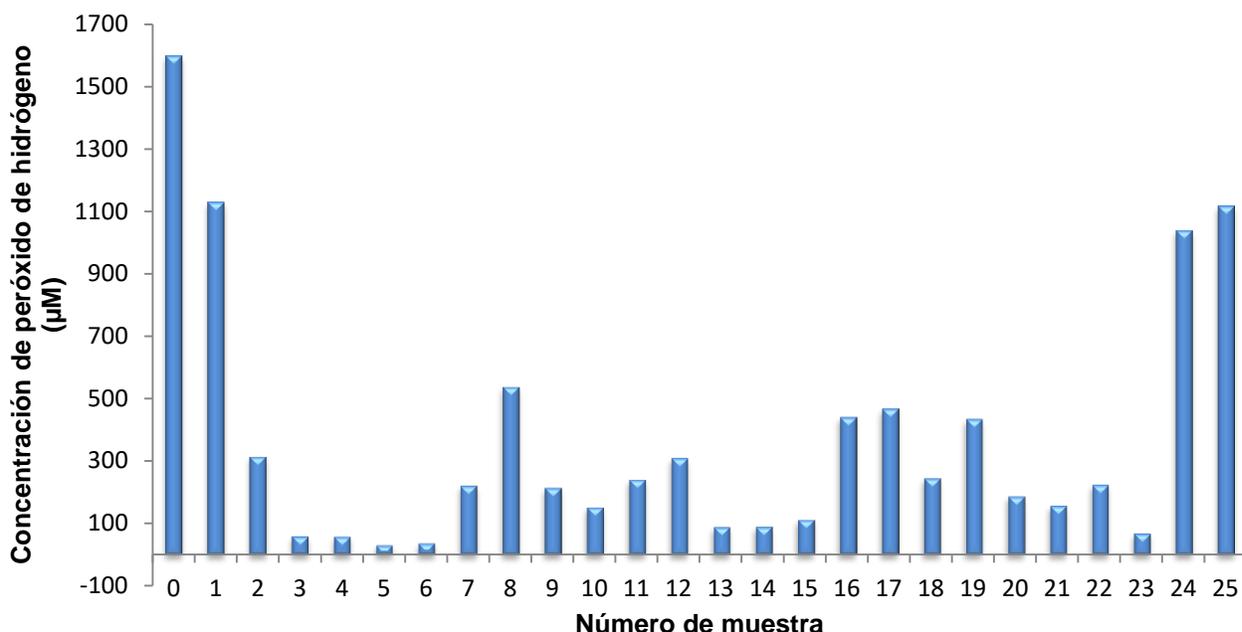
### 5.5 Determinación del contenido de peróxido de hidrógeno.

Se realizó una curva de calibración presentada en la Gráfica 7 con el fin de interpolar la unidad arbitraria de fluorescencia (UAF) de cada muestra de miel y así obtener la concentración total de peróxido de hidrógeno. La curva de calibración obtuvo un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.9971, indicando una buena correlación para interpolar las absorbancias de las muestras y obtener resultados con exactitud.



**Gráfica 7.** Curva de calibración con estándar de  $H_2O_2$  a ~3%.

En la Gráfica 8 se muestran los resultados de la concentración de peróxido de hidrógeno de las mieles tras interpolar sus absorbancias determinadas por triplicado en la curva de calibración. El rango de concentración se ubicó entre 31.08  $\mu M$  y 1598.81  $\mu M$ . La muestra con mayor contenido de  $H_2O_2$  fue  $M_0$  con 1598.81  $\mu M$ , seguida de la muestra  $M_1$  con 1129.92  $\mu M$  y la muestra  $M_{25}$  con 1117.85  $\mu M$ . La muestra  $M_5$ , seguida de la muestra  $M_6$  y  $M_4$  obtuvieron las menores concentraciones con 31.08  $\mu M$ , 37.65  $\mu M$  y 58.9  $\mu M$ , respectivamente.



**Gráfica 8.** Concentración de peróxido de hidrógeno en las muestras de miel

Según el artículo de Weston y colaboradores (2000), la cantidad de  $H_2O_2$  depende en gran medida de la catalasa que proviene de la flora melífera, de cuanto polen obtienen las abejas y de la actividad de la catalasa. El nivel de peróxido de hidrógeno en la miel está esencialmente determinado por la cantidad de catalasa originada en la fuente botánica<sup>32</sup>.

Las muestras  $M_0$ ,  $M_1$ ,  $M_{25}$  y  $M_{24}$ , obtuvieron altas concentraciones de peróxido de hidrógeno, lo cual podría indicar que no había tanta catalasa contenida en la flora melífera de la cual provinieron las muestras, en comparación con el resto de las mieles. También, el contenido de glucosa oxidasa es responsable de la cantidad de peróxido de hidrógeno en las mieles a pesar de tener menor impacto en comparación con la catalasa. La cantidad de glucosa oxidasa tiene menor variación por ser una enzima proveniente de la abeja, sin embargo puede ser un factor determinante en el contenido final de peróxido de hidrógeno de las mieles<sup>32</sup>.

Las muestras con menor concentración de peróxido de hidrógeno fueron las mieles M<sub>5</sub>, M<sub>6</sub> y M<sub>4</sub>, la muestra M<sub>6</sub> a pesar de que no mostró particularidades importantes de destacar obtuvo un casi nulo contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo cual se podría deber a una de las siguientes razones: alto contenido de catalasa proveniente del polen de la flora melífera, la inactivación de la enzima glucosa oxidasa a causa de un proceso térmico involucrado o larga exposición a la luz (provoca descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>59</sup>. En el caso de las muestras M<sub>4</sub> y M<sub>5</sub> provenientes de la misma miel, se sabe que la muestra M<sub>5</sub> fue sometida a un proceso térmico que pudo provocar la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se sospecha que la muestra M<sub>4</sub> al haber recibido tratamiento de filtración pudo haber estado expuesta a fuentes de calor previas a éste.

Se ha reportado la relación entre el contenido de peróxido de hidrógeno y la actividad antibacteriana de la miel. Brudzynski y colaboradores obtuvieron su más alta actividad antibacteriana a una MIC de 6.25% de miel ante *E. coli* y una MIC de 12.5% ante *B. subtilis*, con una concentración de peróxido de hidrógeno registrada de 1181 µM. Se reportó una fuerte correlación entre la cantidad de peróxido de hidrógeno registrada y la actividad antibacteriana de las mieles<sup>43</sup>. En el presente ensayo, la actividad antibacteriana más alta se observó a una MIC de 6.25% de miel sobre las bacterias *L. monocytogenes* y *B.cereus* y a 25% sobre el resto de las bacterias probadas a una concentración de peróxido de hidrógeno de 1129.9 µM (miel M<sub>1</sub>) y una MIC de 6.25% sobre *L. monocytogenes* y *E.coli* resistente ampicilina y a 25% sobre el resto de las bacterias a una concentración de peróxido de hidrógeno de 1598.8 µM (miel M<sub>0</sub>). Igualmente, se observa una alta correlación entre la concentración de peróxido de hidrógeno y la actividad antibacteriana en estas muestras (M<sub>0</sub> y M<sub>1</sub>) en comparación con el resto, exceptuando las muestras M<sub>24</sub> y M<sub>25</sub>, las cuales tuvieron una alta concentración de peróxido de hidrógeno, pero una baja actividad antibacteriana.

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actúa como un oxidante al producir radicales libres hidroxilo (<sup>•</sup>OH) que atacan componentes celulares esenciales, incluyendo lípidos, proteínas y ADN. Se ha propuesto que los grupos sulfhidrilo y los dobles enlaces son particularmente

dañados. En diversos estudios la actividad antibacteriana del  $H_2O_2$  ha demostrado ser más efectiva ante bacterias Gram positivas que Gram negativas, sin embargo la presencia de catalasa o peroxidasa producidas por ciertas bacterias puede incrementar su tolerancia en presencia de bajas concentraciones de  $H_2O_2$ . Esto se reflejó en los resultados obtenidos, ya que *L. monocytogenes* es Gram positiva y fue inhibida al 12.5% de concentración de cinco muestras y al 6.25% de concentración de las dos muestras más activas ( $M_0$  y  $M_1$ ), por otro lado *B. cereus* a pesar de ser Gram positiva demostró mayor resistencia al ser inhibida por solo tres muestras, esto es probablemente debido a que es esporógena. A pesar de que *S. Typhimurium* es catalasa positiva fue inhibida por  $M_0$ ,  $M_1$  y  $M_{11}$  al 12.5% lo cual indica que su actividad de catalasa fue insuficiente ante los niveles de peróxido de hidrógeno de dichas muestras y no protegió su desarrollo bajo las condiciones dadas en el ensayo<sup>60</sup>. Asimismo las cepas de *E. coli* se sabe que son catalasa positivas pero fueron inhibidas por 7 de las mieles por lo que su producción de catalasa tampoco fue suficiente para proteger su desarrollo.

Relacionando los resultados de la prueba de MIC con los índices de  $H_2O_2$  encontrados en las mieles, se observó una tendencia a una mayor actividad ante las bacterias Gram positivas probadas. La causa de la susceptibilidad de las bacterias Gram positivas al  $H_2O_2$  se debe principalmente a su pared celular ya que está compuesta por una membrana citoplasmática y peptidoglicano, capa compuesta por dos derivados de azúcares: N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico; mientras que las Gram negativas además de tener membrana citoplasmática y peptidoglicano contienen una membrana externa compuesta por lipopolisacáridos y proteína<sup>61</sup>. La causa del índice de inhibición mayor en las bacterias Gram positivas del ensayo de MIC se fundamenta en que la membrana celular de las bacterias Gram negativas supone una barrera significativa ante la penetración de moléculas pequeñas e hidrofílicas, como lo es el peróxido de hidrógeno, esta barrera es uno de los factores que le proporcionan mayor resistencia a las bacterias Gram negativas en comparación con las Gram positivas. En las mediciones del nivel de penetración de polisacáridos se muestra que el péptidoglicano y sus polímeros aniónicos asociados forman una red abierta

y accesible para moléculas de pesos moleculares en el rango de 30000 a 57000 Da, lo cual vuelve vulnerable a las Gram positivas a una gran gama de agentes antimicrobianos, incluido el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A pesar de que poseen mecanismos de defensa, la exclusión de la pared celular no es uno de ellos<sup>62</sup>

## **5.6 Comparación entre contenido de fenoles, antioxidantes totales, peróxido de hidrógeno y MIC de las muestras.**

La inhibición del desarrollo bacteriano de la muestra M<sub>0</sub> se podría atribuir a su alta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en relación con las otras muestras.

La muestra M<sub>1</sub> también tuvo un alto índice de inhibición al ser activa frente a todas las cepas bacterianas probadas, lo cual se podría fundamentar en su alto contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> así como de fenoles totales, que actúan desordenando estructuralmente la membrana citoplásmica de las bacterias, específicamente activando irreversiblemente a las deshidrogenasas y oxidasas unidas a la membrana<sup>63</sup>.

Las muestras M<sub>0</sub> y M<sub>1</sub> mostraron indicios de fermentación en la caracterización organoléptica, la fermentación en miel se atribuye comúnmente a géneros de levaduras osmófilas como *Saccharomyces* spp<sup>55</sup> y contribuye en la inhibición bacteriana, por lo que su alta actividad antibacteriana también se fundamenta en esto. Su concentración de peróxido de hidrógeno (la mayor entre las mieles) y su nivel de fermentación son probablemente las principales causas de su actividad antibacteriana.

En las muestras M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> y M<sub>5</sub>, provenientes de la misma miel, se observó como el tratamiento de filtración y calentamiento tuvo efecto en su composición. En la muestra M<sub>5</sub> la exposición al calor provocó la pérdida de actividad antibacteriana, y la descomposición de los compuestos fenólicos, sin embargo la actividad antioxidante no se vio afectada debido a la posible generación de otros

compuestos antioxidantes. Igualmente, la muestra M<sub>4</sub> perdió actividad antibacteriana y concentración de compuestos fenólicos debido a un posible mal manejo en su procesamiento anterior a la filtración.

La muestra M<sub>7</sub> tuvo una relación estrecha entre su contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, por lo tanto sus compuestos fenólicos podrían tener una buena actividad antioxidante. En cuanto a su actividad antibacteriana, fue activa sobre cinco cepas bacterianas, no fue activa sobre *S. dysenteriae* y *E. coli* EPEC. También se caracterizó por tener propiedades organolépticas deseables.

Las muestras M<sub>8</sub> y M<sub>20</sub> obtuvieron una actividad antibacteriana destacable, siendo M<sub>20</sub> activa sobre todas las cepas bacterianas probadas y M<sub>8</sub> sobre cinco de las siete cepas probadas. Las dos muestras obtuvieron alto contenido en compuestos fenólicos totales, siendo M<sub>20</sub> la tercera muestra con mayor concentración de fenoles totales y M<sub>8</sub> la quinta, cabe mencionar que fueron las muestras más oscuras. Sin embargo, la actividad antioxidante no fue muy alta en M<sub>8</sub> en comparación con el resto de las muestras por lo que se sospecha de compuestos fenólicos con baja capacidad antioxidante, en el caso de M<sub>20</sub>, no se logró determinar su actividad debido a que su color causó interferencia en el espectro de absorbancia. A pesar de que su actividad antibacteriana se interrumpió al ser tratadas con catalasa, los niveles de peróxido de hidrógeno están por debajo de la máxima concentración obtenida, lo cual indica menor actividad oxidante.

Las muestras M<sub>24</sub> y M<sub>25</sub> obtuvieron altas concentraciones de peróxido de hidrógeno, pero solo una muestra (M<sub>25</sub>) fue activa a 25% ante *E. coli* EPEC, esto probablemente se debió a la falta de actividad en sus compuestos antibacterianos naturales, ya que la cosecha se realizó entre los meses de agosto y octubre, durante los cuales la flora melífera no tiene la misma disponibilidad que en los meses de marzo a julio, también se sabe que no tuvo un manejo adecuado y que se hizo una mezcla de cosechas, además del mal almacenamiento que tuvo al estar expuesta a la luz solar y a altas temperaturas (Comunicación personal: Jorge Jiménez). Por otra parte, a pesar de que su alto contenido en peróxido de

hidrógeno podría indicar alta actividad antibacteriana, su mayor contenido de humedad y falta de indicios de fermentación facilita el desarrollo de las cepas bacterianas.

## 6. CONCLUSIONES

Únicamente 17 mieles de 26 muestras probadas tienen la calidad necesaria en sus propiedades organolépticas para ser comercializadas, las cuales son: M<sub>2</sub>, M<sub>6</sub>, M<sub>7</sub>, M<sub>8</sub>, M<sub>9</sub>, M<sub>10</sub>, M<sub>11</sub>, M<sub>12</sub>, M<sub>16</sub>, M<sub>17</sub>, M<sub>18</sub>, M<sub>20</sub>, M<sub>21</sub>, M<sub>22</sub>, M<sub>23</sub>, M<sub>24</sub>, y M<sub>25</sub>.

Por zona melífera de recolección, las mieles M<sub>0</sub>, M<sub>1</sub> y M<sub>20</sub> de Cuetzalan, Puebla, Coatepec, Veracruz y Michoacán, respectivamente, fueron las de mayor actividad antibacteriana al ser activas sobre todas las cepas bacterianas probadas y las mieles M<sub>12</sub>, M<sub>22</sub> y M<sub>25</sub> de Acuexcomatl, CDMX; Chontalpa, Tabasco y Cuetzalan, Puebla respectivamente, fueron las de mayor actividad antioxidante.

Por especie de abeja, las mieles con mayor actividad antibacteriana, M<sub>0</sub> y M<sub>1</sub>, son provenientes de abeja del género *Melipona* y M<sub>20</sub> de abeja de la especie *Apis mellifera*. Mientras que las mieles con la mayor actividad antioxidante, M<sub>12</sub> y M<sub>22</sub> son provenientes de abeja *Apis mellifera* y M<sub>25</sub> de abeja *Scaptotrigona mexicana*.

Los resultados presentados revelan que hubo una relación directa entre el contenido de fenoles y el color de las muestras, las mieles más oscuras (M<sub>1</sub> M<sub>7</sub> M<sub>8</sub> M<sub>19</sub> M<sub>20</sub> y M<sub>22</sub>) fueron seis de las ocho muestras con mayor contenido fenólico.

El mayor contenido de antioxidantes totales lo obtuvieron las muestras M<sub>12</sub>, M<sub>22</sub> y M<sub>25</sub> con un rango de 332.88 a 352.49 µg/mL, cuyo potencial antioxidante se atribuye a diferentes compuestos encontrados en la miel.

El potencial antibacteriano fue determinado principalmente por el peróxido de hidrógeno, ya que al ser descompuesto por la catalasa todas las muestras perdieron su actividad. Entre las cepas bacterianas probadas, *L. monocytogenes* fue la bacteria más susceptible al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Las muestras de miel de la tribu *Meliponini* obtuvieron una alta actividad antibacteriana y antioxidante, sin embargo sus características organolépticas no fueron deseables.

Bajo una visión general, se identificó a las muestras  $M_7$ ,  $M_8$  y  $M_{20}$  como las muestras con la mejor relación obtenida en las pruebas y por lo tanto las muestras con la mayor calidad.

## 7. PERSPECTIVAS

- Realizar la resonancia magnética nuclear a las muestras de miel para la identificación de compuestos activos.
- Medir la concentración de peróxido de hidrógeno en las mieles después de ser tratadas con catalasa para comprobar su ausencia o medir concentración remanente.
- Agregar pruebas de MIC con otras bacterias Gram positivas.
- Realizar pruebas de concentración mínima bactericida (MBC) con cada bacteria probada, después de haber realizado las pruebas de MIC.
- Realizar análisis estadístico para comprobar relación entre contenido de peróxido de hidrógeno y actividad antibacteriana, y entre contenido de fenoles totales y actividad antioxidante.
- Ampliar análisis fisicoquímico y realizar análisis melisopalinológico de las muestras de miel.
- Agregar mayor cantidad de muestras representativas de cada región geográfica incluida, para así tener un perfil característico de calidad de miel de cada región.
- Considerar las mieles de la tribu *Meliponini* como blanco de estudio para la resistencia desarrollada a antibióticos como *E. coli* resistente a ampicilina.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. SAGARPA. Refuerza SAGARPA campañas de apoyo a apicultores contra parásitos de la colmena. (2016). Available at: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/chihuahua/boletines/Paginas/B033-CSCH04-2016.aspx>. (Accessed: 18th April 2017)
2. Magaña, M. Á., Ordóñez, Y. B., García, J. R. & Morales, C. E. Estructura e importancia de la cadena productiva y comercial de la miel en México. *Rev. Mex. Ciencias Pecu.* **3**, 49–64 (2012).
3. Castellanos-Potenciano, B. & Ramírez-Arriaga, E. Zaldivar-Cruz, J. Análisis Del Contenido Polínico De Mieles Apidae ) En El Estado De Tabasco , México. *Acta Zoológica Mex.* **28**, 13–36 (2012).
4. Olagnero, G., Abad, a & Bendersky, S. Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta* 14 (2007). doi:0328-1310
5. Kumul, R. C., Ruiz, J. C. R., Vázquez, E. O. & Campos, M. R. S. Potencial antioxidante de la miel de melipona becheii y su relación con la salud: Una revisión. *Nutr. Hosp.* **32**, 1432–1442 (2015).
6. OMS, (Organization) & (Organization), F. *Codex alimentarius: Azúcares, productos del cacao y el chocolate y productos diversos.* (1995).
7. Fao. Definitions and Uses of Honey. *Off. J. Eur. Communities L10* 81–88 (2001). doi:<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/i0842e/i0842e16.pdf>
8. Boukraa, L. *Honey in Traditional and Modern Medicine.* (2014). doi:10.1201/b15608
9. Valadez Azúa, Raúl (Facultad de Medicina, V. y Z. Imagen Veterinaria. 4–15 (2004).
10. Secretaria de economía. *Guía empresarial- miel.* (2011).

11. Correa Benítez, A. & Guzmán-Novoa, E. ZOOTECNIA APÍCOLA. *FMVZ, UNAM* 19 Available at: [http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/p\\_estudios/apuntes\\_zoo/UNIDAD\\_ZOOTECNIA\\_APICOLA.pdf](http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/p_estudios/apuntes_zoo/UNIDAD_ZOOTECNIA_APICOLA.pdf). (Accessed: 25th September 2017)
12. Bruno, A. *et al.* COMPOSITION OF STINGLESS BEE HONEY : SETTING QUALITY STANDARDS. (2006).
13. May-Itzá, W., Medina, L. A., Moo-Valle, H., González Acereto, J. A. & Quezada-Euán, J. G. MANEJO SUSTENTABLE DE POLINIZADORES: BIODIVERSIDAD, CONSERVACIÓN Y SANIDAD DE LAS ABEJAS DE YUCATÁN. *Memorias VII Cátedra CUMEX 5* (2012).
14. Normex. NMX-F-036 Alimentos-Miel-Especificaciones y métodos de prueba. *Diario Oficial de la Nación 2* (1997).
15. SAGARPA. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Miel. 1–40 (2012).
16. Magaña, M. A. M., Cortés, M. E. T., Salazar, L. L. & Sanginés, J. R. Productividad de la apicultura en México y su impacto sobre la rentabilidad \* Productivity beekeeping in Mexico and its impact on profitability Resumen Introducción. **7**, 1103–1115 (2016).
17. Alvarez-Suarez, J., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T., Mazzoni, L. & Giampieri, F. The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. *Foods* **3**, 420–432 (2014).
18. Karaman, T., Buyukunal, S.K., Vurali, A., Altunatmaz, S. . Physico-chemical properties in honey from different regions of Turkey. *Food Chem.* **123**, 41–44 (2010).
19. Küçük, M., Kolayli, S., Karaoglu, Ş., Ulusoy, E., Baltacı, C., Candan, F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chem.* **100**, 526–534 (2007).

20. Vit, P., Soler, C. & Tomás-Barberán, F. Profiles of phenolic compounds of *Apis mellifera* and *Melipona* spp. honeys from Venezuela. *Zeitschrift fur Leb.-Untersuchung und -forsch.* **204**, 43–47 (1997).
21. Paxton, R. J., Klee, J., Korpela, S. & Fries, I. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* **38**, 558–565 (2007).
22. Gleiter, R. A., Horn, H. & Isengard, H. D. Influence of type and state of crystallisation on the water activity of honey. *Food Chem.* **96**, 441–445 (2006).
23. Doner, L. W. The sugars of honey: A review. *J. Sci. Food Agric.* **28**, 443–456 (1977).
24. White, J. W. *Composition of American Honeys*. (1962).
25. Siddiqui, I. R. & Furgala, B. Isolation and characterization of oligosaccharides (trisaccharides) from honey. *J. Apic. Res.* **7**, 51 (1968).
26. Kaškonienė, V. *et al.* Quantitative and qualitative determination of phenolic compounds in honey. *Cheminé Technol.* **3**, 1392–1231 (2009).
27. Wahdan, H. a. Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection* **26**, 26–31 (1997).
28. Manyi-Loh, C. E. *et al.* Selected South African Honeys and Their Extracts Possess In Vitro Anti-*Helicobacter pylori* Activity. *Arch. Med. Res.* **41**, 324–331 (2010).
29. Libonatti, C., Varela, S. & Basualdo, M. Antibacterial activity of honey: A review of honey around the world. *J. Microbiol. Antimicrob.* **6**, 51–56 (2014).
30. Olaitan, P. B., Adeleke, O. E. & Ola, I. O. Honey: A reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *Afr. Health Sci.* **7**, 159–165 (2007).

31. White, Subers & Shepartz, A. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochim. Biophys. Acta* **73**, 57–70 (1963).
32. Weston, R. J. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: A review. *Food Chem.* **71**, 235–239 (2000).
33. Ferreira, I. C. F. R., Aires, E., Barreira, J. C. M. & Estevinho, L. M. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chem.* **114**, 1438–1443 (2009).
34. Turkmen, N., Sari, F., Poyrazoglu, E. S. & Velioglu, S. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chem.* **95**, 653–657 (2006).
35. White, J. W. The role of HMF and diastase assays in honey quality evaluation.pdf. *Bee World* **75**, 104–117 (1994).
36. Hernandez Alarcón, E. *EVALUACIÓN SENSORIAL*. (2005).
37. Von, W. *et al.* Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie* **35**, 18–25 (2004).
38. Severiano Pérez, P., Gómez Andrade, Dulce María Méndez Gallardo, Carlos Iván Pedrero Fuehrer, Daniel Luis Gómez Corona, C. & Ríos Díaz, Sandra Teresita Escamilla Loeza, Adelina Utrera Andrade, M. *Manual de Evaluación Sensorial*. (2012).
39. Prieto, J. M. Procedure: Preparation of DPPH Radical , and antioxidant scavenging assay. 7–9 (2012).
40. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. & Hawkins Byrne, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* **19**, 669–675 (2006).

41. Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **299**, 152–178 (1998).
42. Invitrogen. Mp22188.Pdf. 1–7 (2009).
43. Brudzynski, K. Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Brock Univ.* (2006).
44. Sanchis-Zapater, L. M. Caracterización de la fracción volátil de mieles de espliego y de tomillo comercializadas en la Comunidad Valenciana. (2015).
45. Fonte, L. *et al.* Caracterización físico-química y organoléptica de miel de *Melipona beecheii* obtenida en sistemas agroforestales. *Pastos y Forrajes* **36**, 345–349 (2013).
46. Afik, O., Dag, A., Kerem, Z. & Shafir, S. Analyses of avocado (*Persea americana*) nectar properties and their perception by honey bees (*Apis mellifera*). *J. Chem. Ecol.* **32**, 1949–1963 (2006).
47. Pyrzynska, K. & Biesaga, M. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **28**, 893–902 (2009).
48. Bertoneclj, J., Doberšek, U., Jamnik, M. & Golob, T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem.* **105**, 822–828 (2007).
49. Padilla, P., Vasquez-Dávila, M., García, T. & Albores, M. L. CONOCIMIENTOS Y PRÁCTICAS NAHUAS SOBRE *Scaptotrigona mexicana* EN CUETZALAN , PUEBLA , MÉXICO. 37–40 (2014).
50. Choi, H. S., Sun Song, H., Ukeda, H. & Sawamura, M. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: Detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4156–4161 (2000).
51. Ramírez-Arriaga, E., Navarro-Calvo, L. A. & Díaz-Carbajal, E. Botanical

characterisation of Mexican honeys from a subtropical region (Oaxaca) based on pollen analysis. *Grana* **50**, 40–54 (2011).

52. Chang, X., Wang, J., Yang, S., Chen, S. & Song, Y. Antioxidative, antibrowning and antibacterial activities of sixteen floral honeys. *Food Funct.* **2**, 541–6 (2011).
53. Okawa, M., Kinjo, J., Nohara, T. & Ono, M. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 1202–1205 (2001).
54. Procházková, D., Boušová, I. & Wilhelmová, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* **82**, 513–523 (2011).
55. Snowdon, J. & Cliver, D. Microorganisms in honey. **31**, (1996).
56. Cabrera, C. E., Gómez, R. F. & Zúñiga, A. E. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colomb. Med.* **38**, 149–158 (2007).
57. Taormina, P. J., Niemira, B. A. & Beuchat, L. R. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int. J. Food Microbiol.* **69**, 217–225 (2001).
58. Roberts, A. E., Maddocks, S. E. & Cooper, R. A. Manuka honey reduces the motility of *Pseudomonas aeruginosa* by suppression of flagella-associated genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 716–725 (2015).
59. Onda, M., Ariga, K. & Kunitake, T. Activity and stability of glucose oxidase in molecular films assembled alternately with polyions. *J. Biosci. Bioeng.* **87**, 69–75 (1999).
60. McDonnell, G. & Russell, A. D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 147–179 (1999).

61. Madigan, Michael, Martinko, John M, Parker, J. *Brock Biología de los microorganismos*. (Pearson Education, 2004).
62. Lambert, P. A. (Aston U. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-positive bacteria and mycobacteria. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* **92**, 46S–54S (2002).
63. Vignoli, R. Esterilizacion y desinfeccion. 1–21 (2002). Available at: [http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap\\_27.pdf](http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap_27.pdf). (Accessed: 2nd January 2018)

## 9. ANEXOS

**Tabla 1.** *Concentración de antioxidante totales en las muestras (media  $\pm$  DE)*

Muestra	Concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Muestra	Concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
M <sub>0</sub>	325.22 $\pm$ 0.02	M <sub>13</sub>	254.61 $\pm$ 0.01
M <sub>1</sub>	194.31 $\pm$ 0.02	M <sub>14</sub>	282.80 $\pm$ 0.02
M <sub>2</sub>	210.37 $\pm$ 0.00	M <sub>15</sub>	115.52 $\pm$ 0.01
M <sub>3</sub>	269.03 $\pm$ 0.02	M <sub>16</sub>	220.98 $\pm$ 0.01
M <sub>4</sub>	262.49 $\pm$ 0.01	M <sub>17</sub>	321.58 $\pm$ 0.01
M <sub>5</sub>	271.05 $\pm$ 0.03	M <sub>18</sub>	244.01 $\pm$ 0.01
M <sub>6</sub>	207.04 $\pm$ 0.04	M <sub>19</sub>	260.37 $\pm$ 0.02
M <sub>7</sub>	303.97 $\pm$ 0.03	M <sub>20</sub>	-
M <sub>8</sub>	180.98 $\pm$ 0.01	M <sub>21</sub>	197.64 $\pm$ 0.01
M <sub>9</sub>	286.43 $\pm$ 0.01	M <sub>22</sub>	349.77 $\pm$ 0.02
M <sub>10</sub>	218.25 $\pm$ 0.05	M <sub>23</sub>	279.77 $\pm$ 0.00
M <sub>11</sub>	315.52 $\pm$ 0.01	M <sub>24</sub>	114.01 $\pm$ 0.01
M <sub>12</sub>	352.49 $\pm$ 0.01	M <sub>25</sub>	332.88 $\pm$ 0.03

**Tabla 2.** *Concentración de fenoles totales en las muestras (media ± DE)*

Muestra	Concentración (µg/mL)	Muestra	Concentración (µg/mL)
M <sub>0</sub>	133.15 ± 0.05	M <sub>13</sub>	226.61 ± 0.02
M <sub>1</sub>	473.26 ± 0.08	M <sub>14</sub>	239.61 ± 0.02
M <sub>2</sub>	73.04 ± 0.03	M <sub>15</sub>	66.46 ± 0.03
M <sub>3</sub>	167.21 ± 0.04	M <sub>16</sub>	204.59 ± 0.02
M <sub>4</sub>	65.85 ± 0.06	M <sub>17</sub>	181.07 ± 0.07
M <sub>5</sub>	30.98 ± 0.07	M <sub>18</sub>	127.36 ± 0.08
M <sub>6</sub>	94.22 ± 0.08	M <sub>19</sub>	454.18 ± 0.03
M <sub>7</sub>	305.79 ± 0.01	M <sub>20</sub>	504.61 ± 0.06
M <sub>8</sub>	463.43 ± 0.08	M <sub>21</sub>	129.27 ± 0.01
M <sub>9</sub>	124.37 ± 0.05	M <sub>22</sub>	267.36 ± 0.11
M <sub>10</sub>	98.60 ± 0.03	M <sub>23</sub>	131.33 ± 0.07
M <sub>11</sub>	169.44 ± 0.04	M <sub>24</sub>	657.25 ± 0.06
M <sub>12</sub>	227.89 ± 0.04	M <sub>25</sub>	557.76 ± 0.01

**Tabla 3.** *Concentración de peróxido de hidrógeno en las muestras (media  $\pm$  DE)*

Muestra	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Muestra	Concentración ( $\mu\text{M}$ )
M <sub>0</sub>	1598.81 $\pm$ 0.03	M <sub>13</sub>	89.43 $\pm$ 0.02
M <sub>1</sub>	1129.93 $\pm$ 0.05	M <sub>14</sub>	90.64 $\pm$ 0.02
M <sub>2</sub>	315.19 $\pm$ 0.04	M <sub>15</sub>	113.26 $\pm$ 0.02
M <sub>3</sub>	60.05 $\pm$ 0.01	M <sub>16</sub>	441.74 $\pm$ 0.00
M <sub>4</sub>	58.90 $\pm$ 0.03	M <sub>17</sub>	468.47 $\pm$ 0.13
M <sub>5</sub>	31.08 $\pm$ 0.02	M <sub>18</sub>	245.85 $\pm$ 0.03
M <sub>6</sub>	37.65 $\pm$ 0.00	M <sub>19</sub>	434.81 $\pm$ 0.02
M <sub>7</sub>	222.11 $\pm$ 0.02	M <sub>20</sub>	187.75 $\pm$ 0.08
M <sub>8</sub>	538.65 $\pm$ 0.02	M <sub>21</sub>	157.88 $\pm$ 0.00
M <sub>9</sub>	214.95 $\pm$ 0.00	M <sub>22</sub>	225.44 $\pm$ 0.01
M <sub>10</sub>	153.01 $\pm$ 0.02	M <sub>23</sub>	69.15 $\pm$ 0.02
M <sub>11</sub>	241.35 $\pm$ 0.02	M <sub>24</sub>	1039.73 $\pm$ 0.00
M <sub>12</sub>	310.60 $\pm$ 0.11	M <sub>25</sub>	1117.85 $\pm$ 0.04