



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS

LABORATORIO FARMACOGNOSIA

**EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES NUTRACÉUTICAS
DE UNA MIEL DE LA TRIBU MELIPONINI**

TESIS EXPERIMENTAL

Que para obtener el título de

BIÓLOGA

Presenta

Itzel Ponce de León Salazar

Directora de tesis

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2021





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Farmacognosia, ubicado en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), perteneciente a la División de Investigación y Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Su dirección estuvo a cargo de la Doctora María Margarita Canales Martínez.

Su revisión se llevó a cabo por el siguiente jurado:

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Dra. Ana Bertha Hernández Hernández

Dra. María Margarita Canales Martínez

Dra. Judith Salas Oropeza

M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla

Para su ejecución se contó con el apoyo de:

Financiamiento UNAM PAPIIT IN205020.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi casa de estudios durante la preparatoria y la licenciatura, concediéndome con ello no sólo herramientas y conocimientos para mi formación como profesionista, sino también personas y experiencias que han sido clave para mi desarrollo como persona.

A mi directora de tesis, la Dra. María Margarita Canales Martínez, quien ha contribuido a mi formación como bióloga desde el comienzo de la carrera universitaria, no sólo al compartir su conocimiento, sino también al ser una fuente de admiración e inspiración como mujer y profesionista, con una excelente ética, calidad y calidez humana. Gracias por la confianza y la oportunidad de formar parte del laboratorio de Farmacognosia, por todo el apoyo, constancia, tiempo y esfuerzo invertidos en el desarrollo de este proyecto, así como por la paciencia, el cariño y la motivación con los que siempre me guio.

A la Dra. Ana Bertha Hernández Hernández, por siempre asesorarme y llevarme de la mano en las diferentes técnicas empleadas para el desarrollo de este proyecto, así como las observaciones realizadas al mismo, y por todo el tiempo, paciencia, afabilidad, dedicación y cariño que me brindó siempre durante mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy, por la disposición y amabilidad que lo caracterizan, así como los comentarios y observaciones realizadas para el enriquecimiento y conclusión de este proyecto.

A la Dra. Judith Salas Oropeza, por la disposición y el tiempo destinados a la lectura y revisión de este trabajo, así como las observaciones aportadas al mismo para su culminación.

Al M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla, del mismo modo, por la disposición y el tiempo destinados a la lectura y revisión de este trabajo, así como las observaciones brindadas al mismo para su concreción.

A mis compañeros del laboratorio de Farmacognosia, por integrarme al equipo de trabajo siempre con mucha calidez, por los buenos momentos y el apoyo que me brindaron. Especialmente quiero agradecer a Uriel, José y Juan por la gran ayuda que me dieron en la realización de ciertas técnicas, explicándome con paciencia y resolviendo las dudas que

podieran presentarse, además de los consejos, las risas y los momentos compartidos, amenizando siempre el trabajo con un poco de humor.

Al laboratorio de Investigación Biomédica en Productos Naturales a cargo del Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy, por el préstamo de equipo para la realización de diversas técnicas, así como el trato tan amable que siempre me dieron.

Finalmente, quiero agradecer al M. en C. Eduardo Zurita, quien ha seguido mi formación como bióloga desde sus inicios. Gracias por el tiempo, consejos, asesoramiento y apoyo que me ha brindado a lo largo de este transcurso.

DEDICATORIAS

A mi madre, tú eres la principal razón por la que el día de hoy puedo escribir estas líneas. A ti te lo debo todo, al ser para mí el ejemplo de una mujer fuerte, comprometida, perseverante y generosa. Gracias infinitas por todo el amor, esfuerzo y coraje con los que has guiado mi camino siempre, por hacer de mí una mujer de bien, por enseñarme a trabajar duro para lograr mis objetivos y por estar conmigo en todo momento, impulsándome a alcanzar mis metas y creyendo siempre en la capacidad que poseo. No existen las palabras que puedan expresar la gratitud y el amor que siento por ti, así que espero puedas sentir una parte de ellos a través de este logro que también es tuyo. Te amo, mamá.

A mi padre, por las veces que me brindaste apoyo moral y económico a lo largo de mi vida académica, por toda la confianza que tienes en mi juicio, mi persona y mi capacidad, y por la contribución que has hecho para la persona que soy hoy en día con todas las enseñanzas y cariño que me has dado. Te amo, papá.

A mi hermana, quien ha sido un pilar fundamental en mi vida. Gracias por el granito de arena que pusiste para que pudiera llegar hasta aquí, aunque en ocasiones eso implicara un cortocircuito; pero, sobre todo, gracias por la complicidad que existe entre tú y yo. Sé que no necesitas un ejemplo a seguir porque en tu interior residen el ingenio, coraje y bondad que guiarán tu camino de la mejor manera, por lo que solo aspiro a ser para ti un poco de inspiración para perseguir tus sueños. Te amo, hermana.

A Levi, mi compañero incondicional. Gracias por todo lo compartido y la paciencia y amor con los que me has acompañado a lo largo de estos años, por motivarme a siempre seguir adelante, por la ayuda y apoyo que me diste a lo largo de mi carrera universitaria y del desarrollo de este proyecto, tanto académica como moral y emocionalmente, así como por siempre creer en mí, incluso más que yo misma. Eres “el trampolín que me ayuda a alcanzar mis metas”. Te amo, amor.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	6
JUSTIFICACIÓN	8
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	9
HIPÓTESIS	9
OBJETIVOS	9
General	9
Particulares	9
MATERIAL Y MÉTODOS	10
Obtención de la muestra	10
Propiedades organolépticas y físicas	10
Color, sabor, olor y consistencia	10
Densidad y humedad	10
Determinación de pH	11
Propiedades químicas	11
Cuantificación de ácidos orgánicos	11
Cuantificación de carbohidratos	11
Cuantificación de proteínas	12
Cuantificación de ácido ascórbico	12
Determinación cualitativa de metabolitos secundarios	13
Capacidad antioxidante	13
Cuantificación de fenoles totales	13
Extracción de flavonoides	14
Cuantificación de flavonoides totales	14
Capacidad antioxidante por reducción del radical DPPH	14

Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos (HPLC-DAD)	15
Pruebas biológicas	16
Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana	16
Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica	17
RESULTADOS	18
Obtención de la muestra	18
Propiedades organolépticas y físicas	18
Color, sabor, olor y consistencia	18
Densidad, humedad y determinación de pH	18
Propiedades químicas	19
Cuantificación de ácidos orgánicos	19
Cuantificación de carbohidratos	19
Cuantificación de proteínas	20
Cuantificación de ácido ascórbico	21
Determinación cualitativa de metabolitos secundarios	21
Capacidad antioxidante	22
Cuantificación de fenoles totales	22
Extracción de flavonoides	22
Cuantificación de flavonoides totales	22
Capacidad antioxidante por reducción del radical DPPH	23
Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos (HPLC-DAD)	23
Pruebas biológicas	26
Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana	26
Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica	28
DISCUSIÓN	29

CONCLUSIONES	43
LITERATURA CITADA	44

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Bacterias de interés clínico evaluadas.....	17
Cuadro 2. Hongos levaduriformes de interés clínico evaluados.....	17
Cuadro 3. Caracterización organoléptica de la miel de <i>Scaptotrigona mexicana</i>	18
Cuadro 4. Caracterización fisicoquímica de la miel de <i>Scaptotrigona mexicana</i>	19
Cuadro 5. Espectros y picos máximos de absorción UV a 280 nm del extracto de flavonoides recuperado de la miel de <i>Scaptotrigona mexicana</i>	25
Cuadro 6. Efecto antibacteriano de la miel de <i>Scaptotrigona mexicana</i> sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas de interés clínico.	27
Cuadro 7. Efecto antifúngico de la miel de <i>Scaptotrigona mexicana</i> sobre hongos levaduriformes de interés clínico.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del municipio Papantla en el estado de Veracruz	10
Figura 2. Curva patrón de glucosa [200 $\mu\text{g/mL}$], leída a 565 nm.	20
Figura 3. Curva patrón de albúmina bovina sérica [100 $\mu\text{g/mL}$], leída a 595 nm.	20
Figura 4. Curva patrón de ácido ascórbico [1 $\mu\text{g/mL}$], leída a 760 nm.	21
Figura 5. Curva patrón de ácido gálico [1 mg/mL], leída a 450 nm.....	22
Figura 6. Comatograma del análisis HPLC-DAD para la identificación de compuestos presentes en el extracto de flavonoides recuperado de la miel de <i>Scaptotrigona mexicana</i>	23
Figura 7. Halos de inhibición de la miel de <i>Scaptotrigona mexicana</i> y de cloranfenicol (sensidiscos blancos 25 μg) sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas de interés clínico.....	26

Figura 8. Actividad antibacteriana de miel de *Scaptotrigona mexicana* sobre bacterias Gram positivas(+) y Gram negativas(-) de interés clínico.....28

Figura 9. Halos de inhibición de la miel de *Scaptotrigona mexicana* y de nistatina (sensidiscos blancos 25 μ g) sobre hongos levaduriformes de interés clínico.29

ABREVIATURAS

ANOVA Análisis de Varianza

HPLC-DAD Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos (por sus siglas en inglés)

DPPH Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil

MeOH Metanol

TCA Ácido tricloroacético

TR Tiempo de retención

mAU Micro unidades de absorbancia

nm Nanómetros

rpm Revoluciones por minuto

M Molar

N Normal

m eAG Miligramos equivalentes de Ácido Gálico

m eAO Miligramos equivalentes de Ácidos Orgánicos

m eQ Miligramos equivalentes de Quercetina

RESUMEN

La miel es una sustancia elaborada por las abejas a partir del néctar de las flores. Para que sea considerada de buena calidad, debe cumplir con ciertos parámetros fisicoquímicos y tener propiedades que coadyuven al combate de enfermedades, por lo que puede considerarse un producto nutracéutico, mismo que se define como alimentos o componentes nutricios de éstos, que proveen beneficios para la salud de los seres humanos o para la prevención y tratamiento de determinados padecimientos o malestares. En la actualidad, el uso de la miel de abejas sin aguijón es principalmente medicinal, sin embargo, a pesar de existir una gran variedad de especies, se han realizado pocos estudios sobre la composición de su miel y ningún país ha elaborado estándares para su control de calidad. El objetivo de este trabajo fue evaluar las propiedades nutracéuticas de la miel de *Scaptotrigona mexicana*, con la finalidad de aportar información que contribuya al establecimiento de un estándar para sus diferentes características. Para ello se caracterizó una miel procedente de Papantla, Veracruz, evaluando sus propiedades organolépticas, físicas y químicas, la capacidad antioxidante por reducción del radical DPPH y la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar de Kirby-Baüer. Se encontró que posee características organolépticas propias; los valores obtenidos en los análisis físicos y químicos fueron: densidad 1.423 g/mL, humedad 25.4 %, pH 3.78, carbohidratos totales 73.1 %, proteínas 0.540 mg/g, ácidos orgánicos 14.1 mg eqAO/Kg, ácido ascórbico 0.149 mg/g, fenoles totales 1.146 mg eAG/g y flavonoides totales 0.00856 mg eQ/g; la capacidad antioxidante promedio fue 28.46 %. El perfil químico realizado a la miel después de someterla a una digestión química por hidrólisis ácida mediante un análisis HPLC-DAD, evidenció una composición fenólica en su totalidad. La miel presentó actividad antimicrobiana sobre bacterias de interés clínico tanto Gram positivas como Gram negativas, siendo *Staphylococcus epidermidis* la cepa sobre la que tuvo mayor actividad con los halos de disminución (29.33 ± 1.15) e inhibición de crecimiento (15.33 ± 2.08) más grandes; no obstante, no presentó actividad antifúngica sobre hongos levaduriformes. Dadas sus características organolépticas y químicas, así como su capacidad antioxidante y su actividad antimicrobiana, se concluye que la miel de *Scaptotrigona mexicana* es un potencial producto nutracéutico.

Palabras clave: miel, *Scaptotrigona mexicana*, propiedades nutraceúticas, actividad antibacteriana.

INTRODUCCIÓN

Existen aproximadamente 20,000 especies de abejas a nivel mundial, pertenecientes al orden Hymenoptera en el cual se ubica la familia Apidae, que incluye tribus de hábitos altamente sociales, como son las abejas melíferas (Apini) y las abejas sin aguijón (Meliponini), esta última caracterizada por tener el aguijón atrofiado (Michener, 2007).

Los meliponinos se localizan en las regiones tropicales y subtropicales de América, África, Asia y Australia (Sakagami, 1982), siendo el continente americano el que presenta la mayor diversidad de éstos, con más de 400 especies descritas desde el norte de México hasta Argentina (Michener, 2013).

En México se tiene registro de 46 especies de abejas sin aguijón, distribuidas en 16 géneros, de las cuales Veracruz presenta 22, siendo uno de los estados con el mayor número de especies (Ayala, 1999; Ayala et al., 2013; Arnold et al., 2018).

Las abejas son consideradas organismos de suma importancia ecológica y económica debido a sus hábitos alimenticios (Nates-Parra, 2005). Además de elaborar productos como cera y miel, su alimentación basada en el polen y néctar de las flores conlleva a la transferencia de polen desde las anteras ubicadas en los estambres, hasta el estigma de una flor en las plantas angiospermas, proceso conocido como polinización. Estos insectos son los responsables de propiciar la fecundación de alrededor del 80% de las plantas con flor que existen en el planeta y más del 75% de las plantas cultivadas (Pantoja, 2014), dando como resultado la producción de semillas, frutos y plantas, garantizando así la seguridad alimentaria y el equilibrio ecológico (Faegri y Van Der Pijl, 2013).

A su vez, las abejas sin aguijón son consideradas como los polinizadores más importantes en los trópicos, debiendo este estatus a las siguientes razones: son las abejas nativas más comunes y gracias al amplio rango de tamaños que poseen, comprendido entre 1.8 a 13.5 mm (Michener, 2007), polinizan también una amplia variedad de tamaños y formas florales, tanto de flora silvestre como de cultivos de importancia económica, alimentaria y medicinal, como el café, tomate, aguacate, mango, fresa, calabaza, cebolla, chile habanero, entre otros (Giannini et al., 2015; Heard, 1999). Tienen una alta capacidad de reclutamiento de individuos de la colmena para el forrajeo, además de ser constantes

en las visitas florales que realizan (Slaa et al., 2003), logrando polinizar también plantas de periodos cortos de floración (Brosi, 2009).

En su interacción con el ser humano, las abejas sin aguijón pueden considerarse un recurso de gran importancia, ya que además de su participación en el proceso de polinización, son proveedoras de productos básicos insustituibles en la medida que la miel y la cera de estos insectos tuvieron, y aún tienen múltiples aplicaciones en la vida doméstica y económica de las sociedades humanas que conservan su cultura (González-Acereto, 2012).

En la época prehispánica del continente americano, la crianza de abejas sin aguijón o meliponinos, práctica conocida como meliponicultura, fue apreciada por la docilidad y abundancia de estos insectos, además de ser la única fuente de miel y cera antes de la introducción de *Apis mellifera* por parte de los europeos (Zepeda y Arnold, 2018). Mesoamérica es el lugar donde esta práctica tuvo mayor arraigo y desarrollo, en donde la relación entre los meliponinos y la gente ha tenido un valor importante en ámbitos sociales, económicos y religiosos (Kent, 1984).

En el México contemporáneo la meliponicultura se trabaja con aproximadamente 19 de las 46 especies de meliponinos que existen en el país (Zepeda y Arnold, 2018). La crianza de estas abejas en las diferentes comunidades está enfocada principalmente a la obtención de miel, y secundariamente de cerumen, propóleos y polen, productos a partir de los que se obtienen beneficios medicinales, económicos, religiosos y nutricionales (Guzmán et al., 2011).

La miel es una sustancia elaborada por las abejas a partir del néctar de las flores. Su transformación de néctar a miel ocurre principalmente en el estómago de las abejas, donde enzimas rompen los azúcares del néctar y las abejas regurgitan y pasan el néctar a otras obreras de manera repetitiva para evaporar el agua que se encuentra en él y así obtener una miel madura, que es depositada y almacenada en cántaros hechos de cerumen, en los que se da la fermentación natural de la miel y que son sellados por las abejas (Zepeda, 2018).

La composición de la miel es bastante variable y depende principalmente de su fuente floral; sin embargo, ciertos factores externos como los estacionales, ambientales y el procesamiento, también desempeñan un papel importante (Alvarez-Suárez et al., 2010).

Sus principales componentes son: agua; diferentes azúcares representados por monosacáridos como glucosa y fructosa predominantemente, seguidos de disacáridos como sacarosa y maltosa; sustancias nitrogenadas como proteínas y aminoácidos, entre los que destaca la prolina, seguido por ácido glutámico, alanina, fenilalanina, tirosina, leucina e isoleucina, entre otros; enzimas, principalmente diastasa, invertasa, catalasa y glucosa oxidasa; compuestos fenólicos, como ácidos fenólicos y flavonoides; ácidos orgánicos, incluyendo ácido aspártico, butírico, cítrico, acético, fórmico, fumárico, entre otros, siendo el ácido glucónico el predominante; compuestos volátiles tales como monoterpenos, sesquiterpenos y derivados de benceno; vitaminas que incluyen tiamina (B1), riboflavina (B2), ácido nicotínico (B3), ácido pantoténico (B5), piridoxina (B6), biotina (B8 o H) y ácido fólico (B9), así como vitamina C; minerales como potasio, magnesio, calcio, hierro, fósforo, sodio, manganeso, yodo y zinc; carotenoides; entre otros (da Silva et al., 2016; Baltrušaitytė et al., 2007; Cauich-Kumul et al., 2015).

Para que este alimento sea considerado de buena calidad, debe cumplir con ciertos parámetros fisicoquímicos y tener propiedades que coadyuven al combate de enfermedades o malestares. Es por esto por lo que la miel puede considerarse un producto nutracéutico, definido como alimentos o componentes nutricios de éstos, que proveen beneficios para la salud de los seres humanos o para la prevención y tratamiento de los enfermos afectados por determinados padecimientos o malestares (Birujete-Guzmán et al., 2009).

En la actualidad, el uso de la miel de abejas sin aguijón es principalmente medicinal. La miel posee efectos inhibitorios sobre bacterias y levaduras (Dardón y Enríquez, 2008), propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas. Se ha registrado así su aplicación en el tratamiento de cataratas oculares, fatiga, gastritis, úlceras, debilidad pulmonar, tos, heridas, moretones; su uso como laxante, potenciador de fertilidad y complemento nutricional (Vit et al., 2004).

Dentro de las abejas sin aguijón, el género *Scaptotrigona* es bien apreciado para la meliponicultura. En Veracruz, la especie *Scaptotrigona mexicana* es la más abundante y la que produce más miel, siendo privilegiada por su importancia polinizadora regional (Patlán-Martínez y Kañetas-Ortega, 2018). Se aprovecha para meliponicultura, polinización y producción de cerumen y miel (Ayala et al., 2013); la miel de esta especie es muy apreciada por su calidad, teniendo una gran demanda en los mercados de

alimentos orgánicos debido a las propiedades curativas que se le han atribuido (Arzaluz et al., 2002). Entre los nahuas, la miel y propóleo de *S. mexicana* han sido remedio y/o ingrediente en la farmacopea tradicional de Cuetzalan desde tiempos ancestrales, en donde permanece la idea de que la miel es curativa debido a que dentro del pecoreo de las abejas se incluyen algunas plantas medicinales. Ésta se ingiere o aplica directamente para tratar padecimientos como dolor y enfriamiento de estómago, fuego labial, tos, enfriamiento de garganta, carnosidad de los ojos, úlceras estomacales, heridas, llagas en la piel, infertilidad en la mujer y cáncer (Padilla-Vargas et al., 2014).

Esta especie es fácilmente reconocible por ser la única en México con el integumento completamente negro, su longitud corporal va de 5.0 a 5.3 mm y la longitud del ala anterior de 5.1 a 5.4 mm (Ayala, 1999). Su distribución abarca desde Chiapas y por la costa del Golfo de México hasta Tamaulipas, tanto por tierras bajas con Bosque Tropical Perennifolio como en las laderas de las montañas en Bosques de Pino y Bosque Mesófilo de Montaña, a una altitud que oscila alrededor de los 1000 msnm. Se presenta también en forma discontinua al sur del Estado de México, en los alrededores de Ixtapan de la Sal y las montañas cercanas a Zihuatanejo en el extremo más oeste de la Sierra Madre del Sur en Guerrero (Ayala, 1999).

Generalmente, las abejas de esta especie construyen sus nidos en los huecos de troncos o ramas, mismos que se caracterizan por tener una entrada de cera en forma de trompeta (Padilla-Vargas et al., 2014). Dicha anidación permite su reproducción de manera natural, de modo que el realizarla es crucial para su supervivencia. Estas características resultan en una alta vulnerabilidad por parte de estos organismos ante la deforestación y la fragmentación del hábitat, fenómenos consecuentes de actividades antropogénicas como el cambio de uso de suelo, trayendo consigo la disminución de sitios de anidamiento y con ello, amenazando el tamaño de sus poblaciones (García-Flores et al. 2013).

ANTECEDENTES

Souza et al. 2006, evaluaron estudios realizados desde 1964 sobre la composición de 152 mieles de abejas sin aguijón (tribu Meliponini), a fin de proponer requisitos de calidad para este producto. Los parámetros de las mieles oscilaron entre los siguientes valores: humedad (19.9-41.9 g/100g), pH (3.15-4.66), acidez libre (5.9-109.0 meq/Kg), cenizas (0.01- 1.18 g/100g), actividad de la diastasa (0.9-23.0 DN), conductividad eléctrica (0.49-8.77 mS/cm), HMF (0.9-78.4 mg/Kg), actividad de la invertasa (19.8-90.1 IU), nitrógeno (14.34-144.00 mg/100g), azúcares reductores (58.0-75.7 g/100g) y sacarosa (1.1-4.8 g/100g). Concluyen que las directrices ofrecidas pueden ayudar a la expansión consistente de la base de datos fisicoquímicos de miel de abejas sin aguijón, para establecer sus requisitos de calidad en un futuro.

Dardón y Enríquez 2008, efectuaron una caracterización fisicoquímica y antibacteriana de la miel producida en Guatemala de nueve especies de meliponinos, entre las que se encuentra *Scaptotrigona mexicana*. Reportan un pH de 4.04; acidez libre de 12.68 meq/Kg; humedad de 18.74 %; 57.22 % de azúcares reductores y un 57.28 % de azúcares totales para esta miel. La actividad antibacteriana de dicha miel fue probada ante los microorganismos: *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*, mostrando inhibición del crecimiento ante todas las cepas probadas a una concentración de 5 % (v/v).

Catzín-Ventura et al. 2009, realizaron un análisis palinológico de mieles de Yucatán producidas por *Apis mellifera*, *Melipona beecheii* y *Scaptotrigona pectoralis*, de las cuales se evaluó la actividad inhibitoria sobre cuatro bacterias patógenas (*S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *E. coli* y *P. aeruginosa*). *S. aureus* fue inhibida por las 3 mieles, mientras que *E. coli* fue la bacteria que mostró mayor resistencia. Los resultados indican que las mieles provenientes de las dos especies de abejas nativas presentaron una mayor actividad inhibitoria, en comparación con la registrada para *A. mellifera*.

García-Guerra et al. 2009, reportan la evaluación microbiológica de miel producida por *Scaptotrigona mexicana* en Puebla. Se determinó la higiene de dicha miel, a partir de la detección de microorganismos indicadores y se analizó el efecto antimicrobiano de la misma, sobre cepas de bacterias causantes de infecciones. Dichos análisis fueron aplicados a miel con distintos tiempos de almacenamiento, encontrando

que la miel más añejada posee un mayor efecto antimicrobiano, con amplia actividad sobre *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*.

Fuenmayor et al. 2013, analizaron diversas muestras de miel de diferentes géneros de abejas sin aguijón nativas de Colombia, entre los cuales se encuentran *Scaptotrigona limae* y *Scaptotrigona sp.* Los valores obtenidos en los análisis fisicoquímicos para estas especies respectivamente fueron: humedad 25.8 y 26.9 g/100g; glucosa 28.7 y 23.9 g/100g; fructosa 39.0 y 31.8 g/100g; color 54 y 70 mm Pfund; pH 4.5 y 4.2; acidez libre 57.83 y 44.3 meq/Kg. Concluyen que es necesario continuar el proceso de caracterización ya que conduce a un mejor conocimiento de este valioso producto, y al establecimiento de leyes que regulen la falsificación y adulteración.

Jimenez et al. 2016, evaluaron las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de miel de *Scaptotrigona mexicana* y si existen diferencias respecto al tiempo de almacenaje, concluyendo que puede ser almacenada durante al menos tres años sin ser afectada de manera significativa en sus propiedades. Mencionan también que la miel presenta actividad antibacteriana contra bacterias Gram (+) y Gram (-), pero no presenta actividad antifúngica contra la levadura y moho probados.

Nweze et al. 2017, compararon propiedades físicas, bioquímicas y antioxidantes de miel de *Melipona sp.* e *Hypotrigona sp.*, abejas sin aguijón de Nigeria, con la miel de *Apis mellifera* utilizando procedimientos analíticos estándar. Las muestras de miel de *Hypotrigona sp.* en comparación con las otras mieles, tuvieron la media más alta de los siguientes parámetros: acidez total ($35,57 \pm 0,42$ meq/kg); contenido de proteína ($16,58 \pm 0,37$ g/kg); contenido de fenol ($527,41 \pm 3,60$ mg/kg) y ácido ascórbico ($161,69 \pm 6,70$ mg/kg). Sugieren que la miel de *Hypotrigona sp.* es una buena fuente de antioxidantes comparable a la miel de *A. mellifera*.

Grajales-Conesa et al. 2018, analizaron mieles de abejas sin aguijón de diferentes especies y recolectadas en diferentes años en el sur de Chiapas, México; entre las que se encontraba la miel de *Scaptotrigona mexicana*, colectada en el año 2008. Los parámetros fisicoquímicos de interés para este estudio determinados en la miel de esta especie tuvieron los siguientes valores: humedad 23.1 %; pH 3.65; acidez libre 90.33 meq/kg. Así mismo, esta miel fue probada ante las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, presentando ante esta segunda, el mayor efecto bactericida de todas las mieles evaluadas.

Monter 2018, evaluó algunas propiedades nutraceuticas de miel de *Melipona* procedente de Mérida, Yucatán, reportando que rebasa el límite de humedad reportado para *Apis mellifera* y el azúcar encontrado en mayor cantidad fue la fructosa. Concluye que posee capacidad antioxidante y actividad antibacteriana ante bacterias de interés clínico, principalmente *Staphylococcus epidermidis*. Sin embargo, su actividad antifúngica fue baja para hongos filamentosos y nula en hongos levaduriformes.

JUSTIFICACIÓN

La meliponicultura es una práctica ancestral en México que sufrió un gran declive después de la introducción de abejas melíferas, sin embargo, en los últimos años en varios estados del país existe una tendencia hacia la recuperación y fortalecimiento del legado cultural y los conocimientos tradicionales de la crianza de las abejas sin aguijón y de las propiedades que sus productos poseen.

Aunque existe una gran variedad de especies de abejas sin aguijón, se han realizado pocos estudios sobre la composición de su miel y ningún país ha elaborado estándares para su control de calidad, a diferencia de las mieles producidas por *Apis mellifera*, para la cual existe ya una norma oficial de calidad en México (NOM-004-SAG/GAN-2018).

Bajo este contexto, el presente estudio pretende evaluar las propiedades nutraceuticas de la miel de la abeja sin aguijón *Scaptotrigona mexicana*, con la finalidad de aportar información que contribuya al establecimiento de un estándar para sus diferentes características y así poder garantizar su calidad y autenticidad en el mercado. Así mismo, se busca confirmar y ampliar el saber local de los pueblos sobre los posibles usos y las capacidades curativas de la miel de abejas nativas, estimulando a su vez la práctica de la meliponicultura en México.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son las propiedades nutraceuticas de la miel de *Scaptotrigona mexicana* colectada en un meliponario de Papantla, Veracruz y si esta miel tendrá efecto sobre bacterias y hongos de interés clínico?

HIPÓTESIS

Se sabe que el origen botánico y geográfico de la miel, así como la especie productora, tienen gran influencia sobre la composición y, por tanto, las propiedades de esta. Además, se tiene registro del uso de miel de abejas sin aguijón ante diversos padecimientos. Por lo que se espera que la miel de *Scaptotrigona mexicana* tenga propiedades nutraceuticas únicas y actividad antibacteriana y antifúngica ante microorganismos de interés clínico.

OBJETIVOS

General

Evaluar las propiedades nutraceuticas de una miel de la tribu Meliponini.

Particulares

De la miel de *Scaptotrigona mexicana*:

- Identificar las propiedades organolépticas: color, sabor, olor y consistencia.
- Determinar las propiedades físicas y químicas: pH, densidad, humedad, ácidos orgánicos, carbohidratos, proteínas y ácido ascórbico.
- Determinar la capacidad antioxidante por la reducción del radical DPPH, así como la concentración de fenoles y flavonoides totales.
- Determinar la composición química del extracto de flavonoides mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos (HPLC-DAD).
- Valorar de manera cualitativa la actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- Valorar de manera cualitativa la actividad antifúngica sobre hongos levaduriformes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de la muestra

La miel virgen de *Scaptotrigona mexicana* fue proporcionada por el meliponicultor Antonio N, y producida en un meliponario localizado a 20.40°N y 97.39°W dentro del pueblo Gilardo Muñoz, ubicado en Papantla. Este municipio se encuentra en la zona norte del estado de Veracruz, en la sierra Papanteca, a una altura de 180 m.s.n.m. Limita al norte con Cazones de Herrera; al este con Tecolutla y Gutiérrez Zamora; al sureste con Martínez de la Torre;

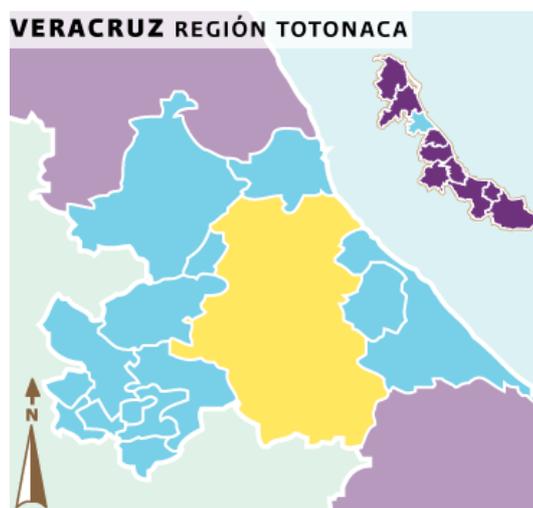


Figura 1. Mapa del municipio Papantla en el estado de Veracruz (INAFED,2010).

al sur con el Estado de Puebla y al oeste con Espinal, Coatzintla y Poza Rica. El tipo de vegetación presente es bosque subtropical perennifolio, con especies de árboles como jonote, laurel, palo mula, cedro, ceiba y algunas variedades de la familia Fabaceae (INAFED,2010).

Propiedades organolépticas y físicas

Color, sabor, olor y consistencia

El color se determinó con la ayuda de un colorímetro HANNA, colocando la muestra directamente en el lente y registrando el valor en mm escala Pfund. El sabor, olor y consistencia se determinaron con base en la NOM-004-SAG/GAN-2018.

Densidad y humedad

Para determinar la densidad de la muestra se midieron la masa y volumen de esta y posteriormente se aplicó la fórmula $\rho=m/v$.

El contenido de humedad se calculó con un refractómetro ATAGO PAL-225.

Determinación de pH

El pH fue medido con un potenciómetro pHTestr 30, el cual se introdujo directamente en la muestra.

Propiedades químicas

Cuantificación de ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos fueron cuantificados mediante una titulación de NaOH al 0.1 N, la cual consiste en una reacción ácido-base o neutralización. Se disolvió 1g de miel en 10 mL de agua destilada y se agregaron 5 gotas de fenolftaleína. Finalmente se realizó la titulación cargando una bureta con 15 mL de la solución titulante hasta que se observó un cambio de coloración con duración mayor a un minuto (Chang, 2002), con lo cual se registraron los mL de NaOH gastados para conocer la cantidad de ácidos orgánicos presentes en la muestra mediante la siguiente fórmula:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

Dónde:

C_1 = Concentración del titulante de NaOH

V_1 = Volumen de NaOH gastado

C_2 =Concentración de ácidos orgánicos en la muestra

V_2 = Volumen de la muestra

Cuantificación de carbohidratos

Para la cuantificación de azúcares totales se determinaron los Grados Brix colocando 3 mL de la miel en un refractómetro ATAGO RePo-4.

Los azúcares reductores se cuantificaron por medio de la técnica de Nelson-Somogyi, en la que la glucosa como agente reductor, reacciona con reactivo de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) produciendo la formación de óxido cuproso (Cu_2O) de color rojo, debido a la donación de electrones del azúcar al ion oxidante. El Cu_2O precipitado no puede valorarse de manera fotométrica, por lo que se trata con reactivo de arsenomolibdato

transformándolo en un complejo azul que se mide en el espectrofotómetro. El agente reductor actúa como el factor limitante, por lo que la cantidad de Cu_2O es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra (Nelson, 1944).

Se realizó una extracción de carbohidratos diluyendo 100 mg de muestra en 2 mL de etanol al 80%, se centrifugó a 10000 rpm por 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se evaporó en vacío a sequedad. Una vez obtenido el extracto, se reconstituyó en 5 mL de agua destilada y se utilizó 1 mL de esta muestra problema para interpolar en una curva patrón de glucosa [200 $\mu\text{g}/\text{mL}$]. La absorbancia fue leída a 565 nm (González y Peñalosa, 2000).

Finalmente, se determinó el porcentaje de fructosa y glucosa en 3 mL de la muestra con un refractómetro ATAGO RePo-4.

Cuantificación de proteínas

La determinación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford, el cual se basa en que el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 existe en dos formas de color diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte a la forma azul al unirse el colorante a la proteína. El complejo proteína-colorante tiene un alto coeficiente de extinción, lo que conduce a una gran sensibilidad en la medición de la proteína (Bradford, 1976).

Se extrajeron las proteínas presentes en 100 mg de miel utilizando 2 mL de solución de metanol-cloroformo-agua (12:5:3) homogeneizado en baño de hielo. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos, se recuperó el sobrenadante, al que se le agregó 1 mL de cloroformo y 1.5 mL de agua destilada, llevándolo a centrifugar por segunda vez con la finalidad de eliminar posibles lípidos presentes.

Con la fase acuosa resultante se procedió a la cuantificación utilizando una curva patrón de albúmina bovina sérica [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$]. Finalmente se leyó a 595 nm en una placa ELISA (González y Peñalosa, 2000).

Cuantificación de ácido ascórbico

La determinación de ácido ascórbico representa la cantidad de vitamina C en la muestra. Se mezclaron 100 mg de la muestra de miel con 900 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% y se homogeneizaron por 5 minutos. Posteriormente, la muestra fue enfriada en un baño de hielo para proceder a su centrifugación a 3000 rpm durante 5

minutos. Se recuperó el sobrenadante, del cual se tomó una alícuota de 0.5 mL y se le agregaron 4.3 mL de agua destilada y 200 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu. Finalmente se realizó una curva patrón con ácido ascórbico como solución stock [1 μ g/mL] y se leyó a una absorbancia de 760 nm (Jagota y Dani, 1982).

Determinación cualitativa de metabolitos secundarios

Para la determinación cualitativa de fenoles, flavonoides y alcaloides, se disolvieron 0.5 g de miel en 5 mL de agua y se separó en tres partes iguales para su evaluación.

Se agregaron de 3 a 5 gotas de FeCl_3 para la determinación de fenoles, de AlCl_3 para flavonoides y para alcaloides primero se agregaron 2 gotas de HCl para posteriormente agregar solución Dragendorff y Mayer y observar la reacción (Domínguez, 1973).

Capacidad antioxidante

Cuantificación de fenoles totales

Para determinar fenoles totales se utilizó el método modificado de Singleton et al., 1999. Se midió por espectrofotometría con base en una reacción colorimétrica de óxido-reducción, utilizando reactivo de Folin-Ciocalteu como agente oxidante. Para ello, se construyó una curva patrón de ácido gálico [0.2 mg/mL], la muestra problema se preparó con una concentración de 300 mg/mL, de la cual se tomó una alícuota de 250 μ L, para luego completar a 1 mL con agua destilada y se adicionaron 7 mL más de agua, 0.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 1.5 mL de Na_2CO_3 . Después de 2 horas de reacción a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia a 760 nm (Oropeza, 2012). Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de miel (mg eAG/g).

Extracción de flavonoides

Se realizó la extracción de flavonoides mediante una hidrólisis ácida. Se disolvieron 5 g de miel en 6 mL de HCl 2 M y se dejó en baño maría durante una hora para posteriormente neutralizar con NaOH 2 M.

Finalmente se agregó diclorometano grado HPLC y se recuperaron ambas fases, de las cuales se utilizó la fase de diclorometano. Una vez evaporado el solvente, se pesó la cantidad resultante para obtener el rendimiento (Vidal, 1977).

Cuantificación de flavonoides totales

Con la extracción de flavonoides obtenida, se cuantificaron los flavonoides totales por el método de Dowd (Ramamoorthy y Bono, 2007). Para este ensayo se utilizó tricloruro de aluminio (AlCl_3). El fundamento de esta metodología está basado en la reacción de los iones de aluminio con los flavonoides, la cual vira a color amarillo por la formación de complejos estables ácidos con el grupo ceto en C-4 o el grupo hidroxilo C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles, además de la formación de complejos lábiles ácidos con los grupos hidroxil en el anillo A o B de los flavonoides (Kalita et al., 2013). Finalmente, con un stock de quercetina [1 mg/mL] se construyó una curva patrón con las concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ppm y se les agregó 1 mL de AlCl_3 al 2%, también fue preparado un stock con 3 mg del extracto en 1 mL de MeOH, del cual se tomaron 600 μL y se agregaron 600 μL AlCl_3 al 2%, después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia a 450 nm y se interpolaron los resultados en la curva, finalmente reportados en miligramos equivalentes de quercetina por gramo de miel (mg eQ/g).

Capacidad antioxidante por reducción del radical DPPH

Para el ensayo de capacidad antioxidante se utilizó también el extracto de flavonoides. Se midió por la reducción del radical DPPH (Okusa et al., 2007), el cual mide la capacidad de los antioxidantes de atrapar el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (Meda et al., 2005; Bertoneclj et al., 2007). La estabilidad relativa de este radical (2,2-difenil-1-picrilhidracil) se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en disolución etanólica, a 540 nm. Cuando una disolución de DPPH está en

contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical (R) se produce la forma reducida DPPH-H o DPPH-R, con el consecuente cambio de color de violeta a amarillo, coloración dada por el grupo picril (Molyneux, 2004).

Para esto, se preparó una solución stock donde se diluyeron 3 mg del extracto en 3 mL de MeOH grado HPLC y se creó un gradiente de concentraciones (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 ppm) para observar la relación de éstas con la actividad antioxidante. En una placa de ELISA de 96 pozos, se agregaron 50 μ L de la solución problema a las diferentes concentraciones (1-100 ppm) por triplicado, a los que posteriormente se adicionaron 150 μ L de la solución metanólica de DPPH. Inmediatamente se protegió de la luz envolviéndola con papel aluminio y se incubó en agitación constante durante 30 minutos a 37°C. Finalizada la incubación, se determinó la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA SLT Spectra. Los resultados se expresaron como porcentaje de reducción promedio (Okusa et al., 2007) aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción de DPPH} = (C-E/C) * 100$$

Dónde:

C= Absorbancia control (DPPH disuelto en MeOH)

E= Absorbancia experimental (Mezcla DPPH (150 μ L) + compuesto problema (50 μ L)).

Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos (HPLC-DAD)

Por último, se llevó a cabo la caracterización química del extracto de flavonoides mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos (HPLC-DAD). Para este análisis se empleó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución modelo Hewlett-Packard HP serie 1100 (Hewlett-Packard, Wilmington DE, USA), equipado con el software Agilent ChemStation for LC and LC/MS systems.

Las condiciones establecidas fueron las siguientes:

- Columna Discovery C-18 de 250 x 4.6 mm con un tamaño de película de 5 µm.
- Fase móvil: metanol-acetonitrilo-agua (25:25:50).
- Flujo: 1 mL/min.
- Detector de arreglo de diodos (DAD).
- Longitud de onda de 280 nm, realizando un barrido completo de 200-400 nm.

Pruebas biológicas

Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana

Para determinar el efecto antibacteriano se empleó el método de difusión en agar de Kirby-Baüer (Vanden-Berghe y Vlietinck, 1991; CLSI, 2012), utilizando caldo y agar Müller-Hinton como medio de cultivo. Se usaron bacterias Gram (+) y Gram (-) de interés clínico (Cuadro 1) y se colocaron discos de papel Whatman N° 5, de 5 mm de diámetro previamente esterilizados, impregnados con 25 µg de cloranfenicol como control positivo.

Se hicieron pozos en el agar con la boquilla de pipetas Pasteur, en los que se colocó la miel directamente hasta llenar el pozo, esto por triplicado. Las cajas se incubaron 24 horas a 37 °C y finalmente los halos de inhibición y la reducción del crecimiento fueron medidos en mm, calculándose el promedio para cada cepa probada. Una vez obtenidos, los datos se analizaron por medio de un Análisis de Varianza factorial (ANOVA) para verificar si existían diferencias significativas, en el que los factores considerados fueron miel y cepas bacterianas.

Cuadro 1. Bacterias de interés clínico evaluadas.

Gram	Cepa	Clave de catálogo
+	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33592, donada por el laboratorio de Análisis Clínicos FES Iztacala
+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATTC 12228
-	<i>Escherichia coli</i>	Caso clínico 1, donada por el laboratorio de Análisis Clínicos FES Iztacala
-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CDBB-B-999

Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica

La actividad antifúngica se determinó con el método de difusión en agar (CLSI, 2012), utilizando agar PDA y caldo Sabouraud como medio de cultivo para la evaluación de hongos levaduriformes de interés clínico (Cuadro 2), asimismo se colocaron discos de papel Whatman N° 5, de 5 mm de diámetro previamente esterilizados, impregnados con 25 µg de nistatina para el control positivo.

Se hicieron pozos en el agar con la boquilla de pipetas Pasteur, en los que se colocó la miel directamente hasta llenar el pozo, esto por triplicado. Las cajas se incubaron 24 horas a 36 °C y finalmente los halos de inhibición y la reducción del crecimiento fueron medidos en mm, calculándose el promedio para cada cepa probada.

Cuadro 2. Hongos levaduriformes de interés clínico evaluados.

Tipo de hongo	Cepa	Clave de catálogo
Levaduriforme	<i>Candida albicans</i>	Caso clínico, donada por el laboratorio de Análisis Clínicos FES Iztacala
Levaduriforme	<i>Candida albicans</i>	ATCC10231 sensible
Levaduriforme	<i>Candida tropicalis</i>	Donada por el hospital Los Ángeles
Levaduriforme	<i>Candida tropicalis</i>	Donada por el hospital Los Ángeles

RESULTADOS

Obtención de la muestra

La miel fue colectada recién cosechada en un meliponario del pueblo Gilardo Muñoz, ubicado en Papantla, Veracruz, en el mes de septiembre del año 2019.

Propiedades organolépticas y físicas

Color, sabor, olor y consistencia

Las propiedades organolépticas, es decir, características físicas perceptibles a través de los sentidos, tales como color, sabor, olor y consistencia, se muestran reportadas según los criterios determinados en la Norma Oficial Mexicana NOM-004-SAG/GAN-2018 (Cuadro 3).

Cuadro 3. Caracterización organoléptica de la miel de *Scaptotrigona mexicana*.

Propiedades organolépticas de la miel evaluada	
Color	150 mm escala Pfund, Ámbar oscuro
Sabor	Agridulce
Olor	Cítrico
Consistencia	Fluida

El valor asignado por el colorímetro HANNA fue de 150 mm escala Pfund, correspondiente a un color ámbar oscuro, por su parte el sabor, olor y consistencia se determinaron de manera sensorial con base en la norma antes mencionada, por medio de la percepción de la investigadora y dos personas más a las que se les solicitó olieran y probaran la miel para consensuar el dato.

Densidad, humedad y determinación de pH

Asimismo, se presentan algunas de las propiedades físicas y químicas de la miel evaluada (Cuadro 4).

Cuadro 4. Caracterización fisicoquímica de la miel de *Scaptotrigona mexicana*.

Propiedades fisicoquímicas de la miel evaluada	
Densidad	1.423 g/mL
Humedad	25.4 %
pH	3.78

Propiedades químicas

Cuantificación de ácidos orgánicos

La titulación de los ácidos orgánicos presentes en la miel realizada con NaOH al 0.1 N, por medio de la reacción de neutralización permitió determinar una cantidad de 14.1 meq AO/Kg (miliequivalentes de ácidos orgánicos en un kilogramo de miel).

Cuantificación de carbohidratos

Con la ayuda del refractómetro ATAGO RePo-4, se determinó un contenido de azúcares totales de 73.1 %, correspondiendo un 47.3 % a fructosa y 25.8 % a glucosa.

Los azúcares reductores se cuantificaron gracias a que la cantidad de Cu_2O formada en la técnica de Nelson-Somogyi es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra. Tras interpolar en una curva patrón de glucosa (Figura 2), se determinó una cantidad de 35.84 % azúcares reductores en la miel evaluada.

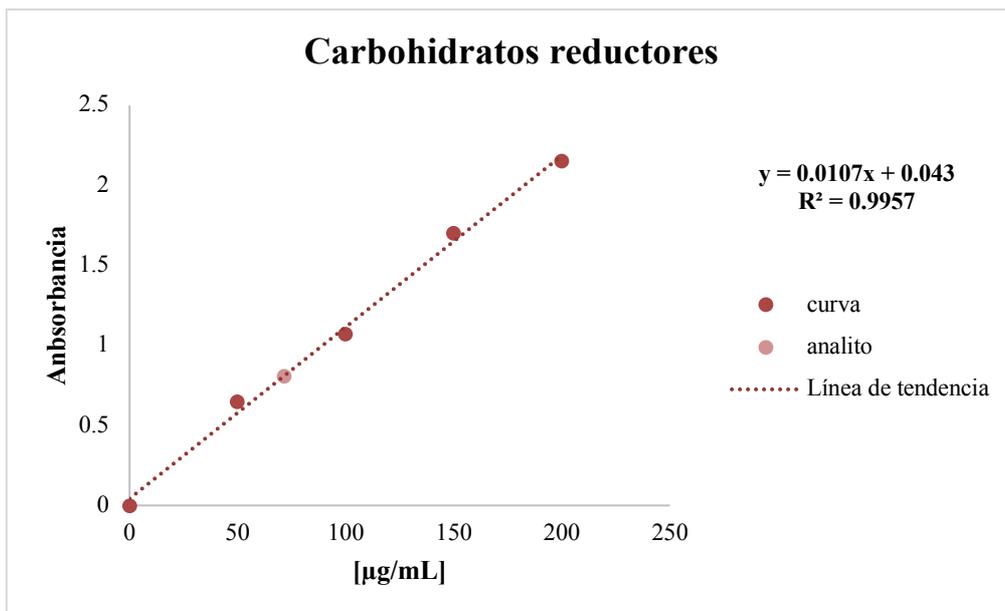


Figura 2. Curva patrón de glucosa [200 µg/mL], leída a 565 nm.

Cuantificación de proteínas

El complejo proteína-colorante de color azul formado en el método de Bradford, fue leído en un espectrofotómetro e interpolado en una curva patrón de albúmina bovina sérica (Figura 3), reflejando un contenido de proteínas de 0.540 mg/g (miligramos de proteína en un gramo de miel), representando un 0.054 % en la composición de la miel evaluada.

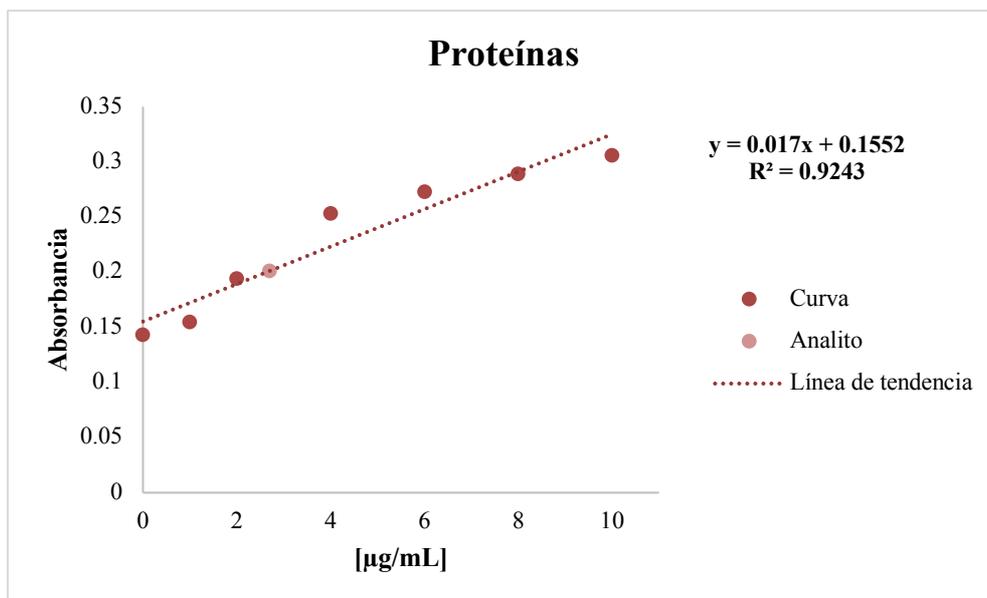


Figura 3. Curva patrón de albúmina bovina sérica [100 µg/mL], leída a 595 nm.

Cuantificación de ácido ascórbico

El reactivo de Folin-Ciocalteu permitió evaluar por espectrofotometría la cantidad de ácido ascórbico presente en la muestra, interpolando en una curva patrón de ácido ascórbico (Figura 4), se determinó un contenido de 0.149 mg/g (miligramos de ácido ascórbico por gramo de miel), representando un 0.0149 % en la composición de la miel evaluada.

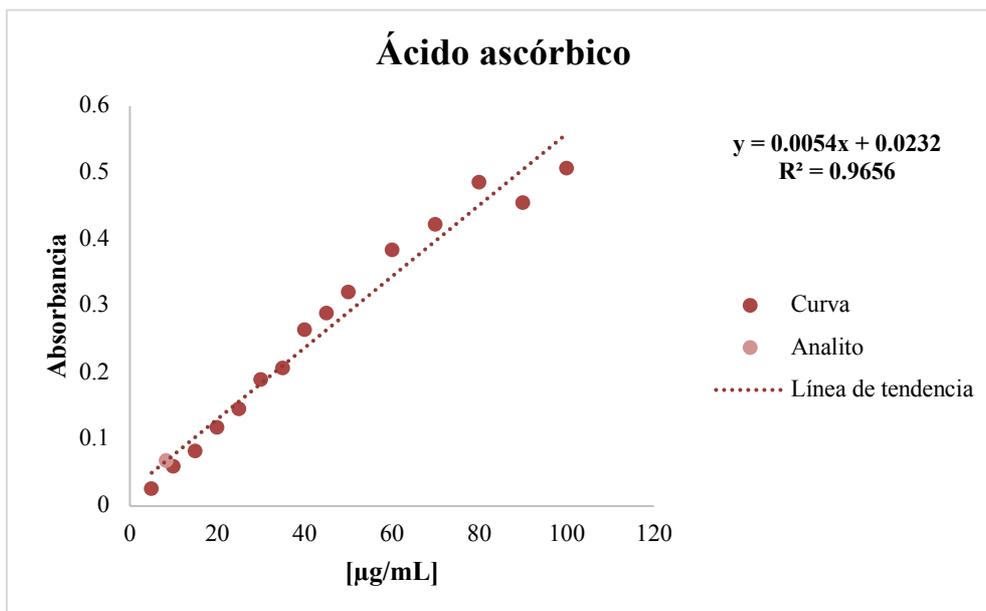


Figura 4. Curva patrón de ácido ascórbico [$1 \mu\text{g/mL}$], leída a 760 nm.

Determinación cualitativa de metabolitos secundarios

Después de tratar la miel con FeCl_3 para la determinación de fenoles, no se observó ningún cambio de coloración, por lo que se determinó como negativa la presencia de dichos compuestos en la muestra. En el caso del tratamiento con AlCl_3 para determinar la presencia de flavonoides y HCl y solución Dragendorff y Mayer para alcaloides, del mismo modo no se observó ninguna reacción, por lo que la presencia de los tres metabolitos secundarios en la muestra se tomó como negativa. No obstante, debido a que esta determinación es cualitativa y en la literatura se reporta la presencia de fenoles dentro de la composición de la miel, se optó por realizar una prueba cuantitativa que al tener una mayor sensibilidad permitiera determinar con certeza en qué cantidad se encontraban presentes.

Capacidad antioxidante

Cuantificación de fenoles totales

Gracias a la reacción colorimétrica de óxido-reducción dada por el reactivo de Folin-Ciocalteu, la muestra fue evaluada por espectrofotometría e interpolando en una curva patrón de ácido gálico (Figura 5), se determinó un contenido de 1.146 mg eAG/g (miligramos equivalentes de ácido gálico en un gramo de miel).

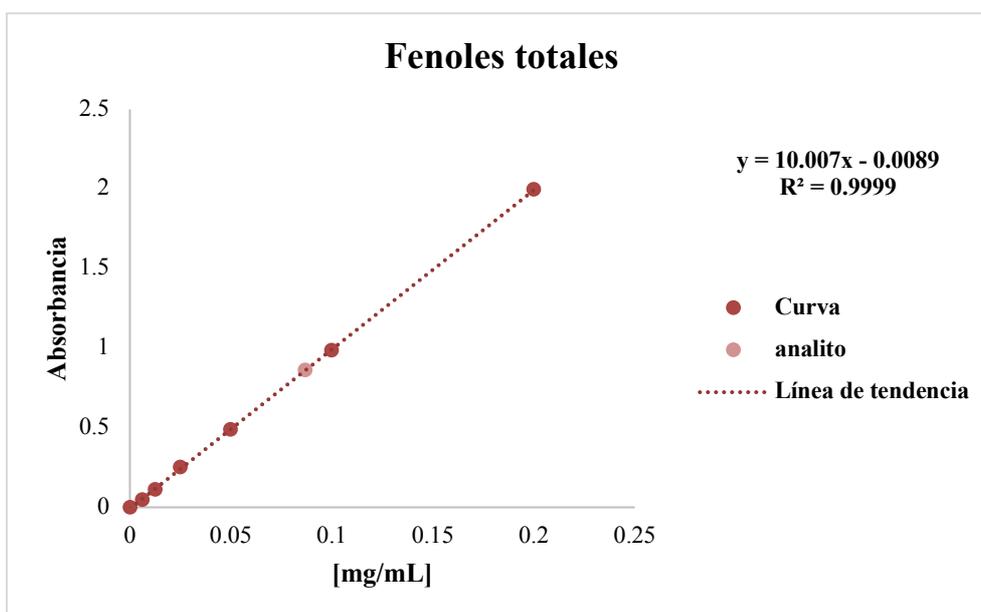


Figura 5. Curva patrón de ácido gálico [1 mg/mL], leída a 450 nm.

Extracción de flavonoides

La extracción de flavonoides por hidrólisis ácida tuvo un rendimiento de 8 mg/g (miligramos de flavonoides por gramo de miel).

Cuantificación de flavonoides totales

La formación de complejos estables ácidos que dan una coloración amarilla por la reacción del AlCl_3 con los flavonoides, fue medida en el espectrofotómetro e interpolada en una curva patrón de quercetina, obteniendo un contenido de 0.00856 mg

eQ/g (miligramos equivalentes de quercetina en un gramo de miel). Esta medición fue realizada directamente con el extracto de flavonoides obtenido por hidrólisis ácida.

Capacidad antioxidante por reducción del radical DPPH

El ensayo de capacidad antioxidante fue realizado también con el extracto de flavonoides. Para ello se midió la reducción del radical DPPH con el consecuente cambio de color de violeta a amarillo, encontrando una capacidad antioxidante promedio de 28.46%.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos (HPLC-DAD)

Se analizó la composición química del extracto de flavonoides mediante una Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos (HPLC-DAD). El cromatograma obtenido (Figura 6) y los grupos identificados (Cuadro 5) se presentan a continuación.

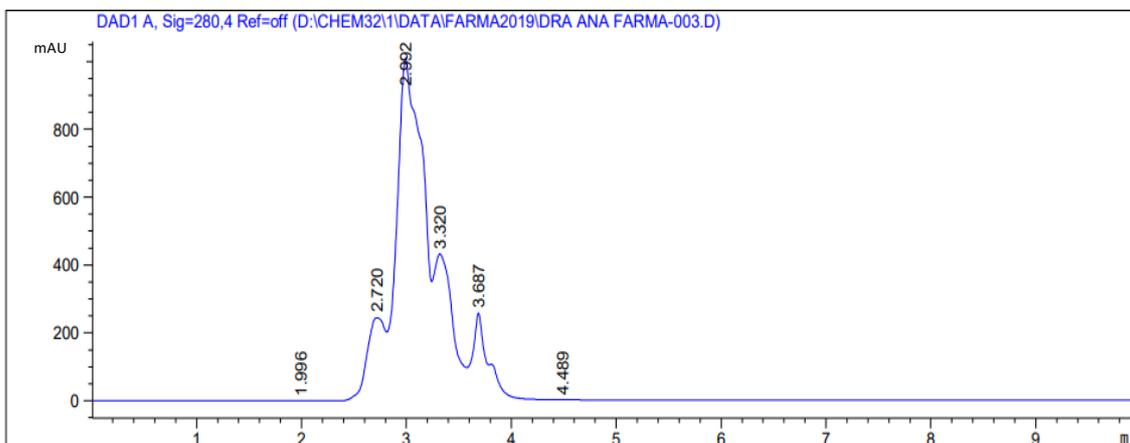
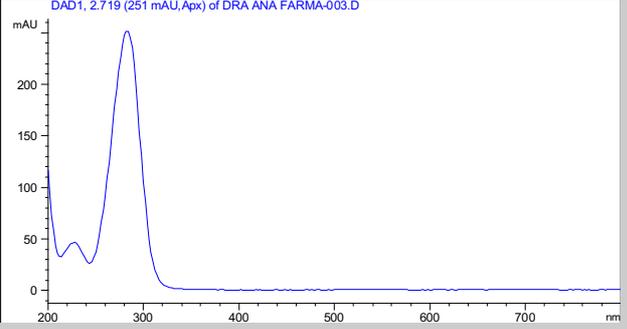
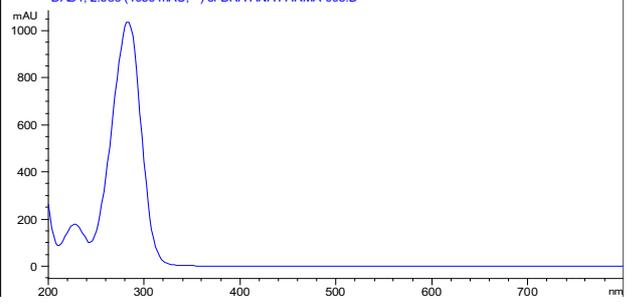
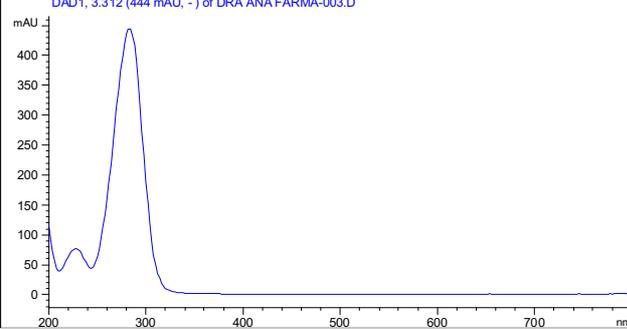
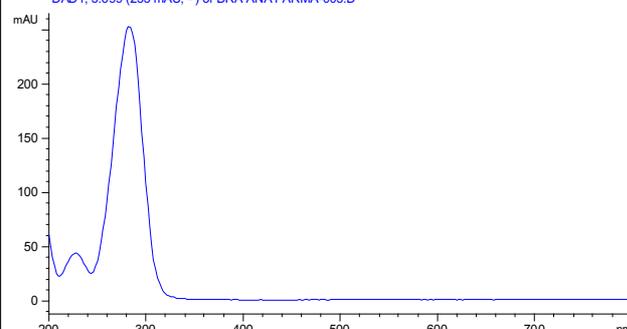


Figura 6. Comatograma del análisis HPLC-DAD para la identificación de compuestos presentes en el extracto de flavonoides recuperado de la miel de *Scaptotrigona mexicana*.

El eje de las abscisas presenta el Tiempo de Retención (TR) en minutos, es decir, el tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra en la columna cromatográfica y la llegada a un pico de analito al detector. El eje de las ordenadas presenta las Micro Unidades de Absorbancia (mAU).

Debido a que no hubo coincidencias con la base de datos del equipo empleado, la determinación de los compuestos presentes en el extracto sólo fue posible a nivel de grupo químico, mediante la comparación de los espectros y picos máximos de absorción UV obtenidos (Cuadro 5) y los espectros UV descritos por Harborne, 1998.

Cuadro 5. Espectros y picos máximos de absorción UV a 280 nm del extracto de flavonoides recuperado de la miel de *Scaptotrigona mexicana*.

Tiempo de retención (min)	UV λ máx (nm)	Espectro	Tipo de compuesto
2.719	228, 282	 <p>DAD1, 2.719 (251 mAU, Apex) of DRA ANA FARMA-003.D</p>	Fenol
2.986	228, 282	 <p>DAD1, 2.986 (1036 mAU, -) of DRA ANA FARMA-003.D</p>	Fenol
3.312	228, 282	 <p>DAD1, 3.312 (444 mAU, -) of DRA ANA FARMA-003.D</p>	Fenol
3.699	228, 282	 <p>DAD1, 3.699 (253 mAU, -) of DRA ANA FARMA-003.D</p>	Fenol

Pruebas biológicas

Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana fue evaluada de manera cualitativa, colocando la miel directamente en los pozos del agar. Tuvo actividad sobre todas las bacterias evaluadas, presentando dos tipos de efectos. El primero fue la disminución del crecimiento, la cual se refleja como la zona en que la densidad bacteriana es menor, y, por tanto, la turbidez de la placa en esta zona es más tenue que la presente en las zonas en que la miel no tuvo alcance; el segundo efecto fue la inhibición del crecimiento, observable como la zona en que no se presenta turbidez alguna ya que no hay crecimiento de bacterias (Figura 7).

Los efectos que la miel tuvo sobre las diferentes cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas están reportados como el promedio de los halos formados en las 3 repeticiones realizadas por cada cepa y su desviación estándar asociada (Cuadro 6).

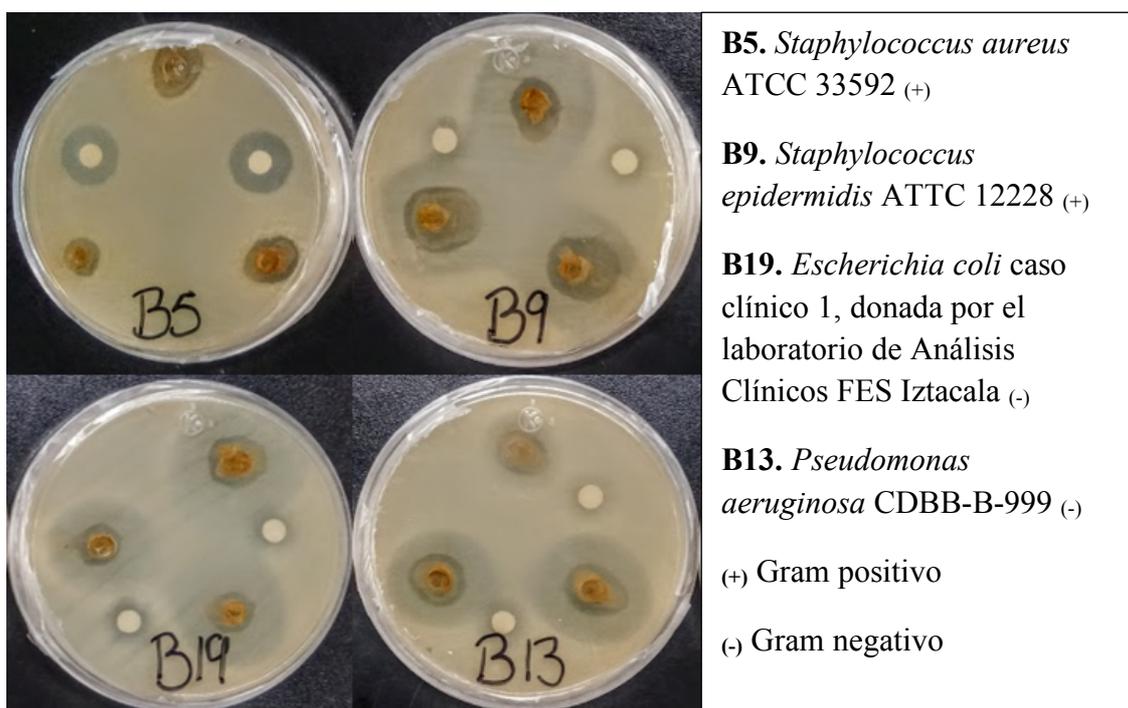


Figura 7. Halos de inhibición de la miel de *Scaptotrigona mexicana* y de cloranfenicol (sensidiscos blancos 25µg) sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas de interés clínico.

Cuadro 6. Efecto antibacteriano de la miel de *Scaptotrigona mexicana* sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas de interés clínico.

Cepa	Miel DC	Miel IC	Cloranfenicol
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33592 (+)	SE	12.66±3.21	15.5±0.70
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATTC 12228 (+)	29.33±1.15	15.33±2.08	6.5±0.70
<i>Escherichia coli</i> caso clínico 1, donada por el laboratorio de Análisis Clínicos FES Iztacala (-)	28.33±2.51	12.66±1.52	9.0±1.41
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CDBB-B-999 (-)	29.00±4.58	14.66±2.51	9.5±0.70
Longitud promedio de halos de inhibición reportados en mm con su respectiva desviación estándar. (+) Gram positivo, (-) Gram negativo, SE Sin efecto, DC Disminución del crecimiento, IC Inhibición del crecimiento.			

Tras realizar un Análisis de Varianza (ANOVA), se encontraron diferencias significativas entre el efecto de la miel y el del cloranfenicol (control positivo) sobre las bacterias para todas las cepas probadas ($F=114.285$, $P<0.01$), así como entre las diferentes cepas ($F=13.428$, $P<0.01$). *Staphylococcus epidermidis* fue la cepa sobre la que la miel tuvo mayor actividad antibacteriana, con los halos de disminución e inhibición de crecimiento más grandes; a su vez, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* presentaron los halos de inhibición más pequeños; sin embargo, la cepa sobre la que la miel tuvo menor actividad antibacteriana fue *S. aureus*, ya que fue la única que no presentó disminución del crecimiento, además de que el cloranfenicol tuvo sobre ella un mayor efecto antibacteriano que la miel.

No obstante, a excepción de dicha bacteria, todas las cepas probadas tuvieron tanto disminución como inhibición del crecimiento, además de tener un halo de inhibición mayor que el presentado por el cloranfenicol, que en este caso fungió como control positivo (Figura 8).

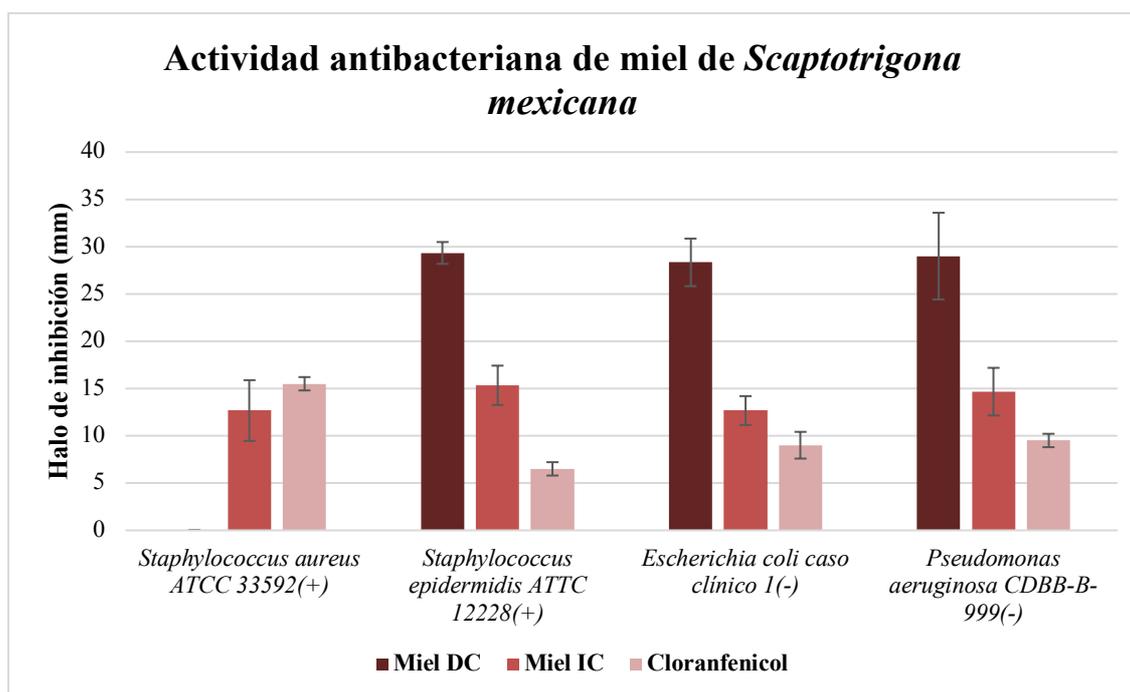


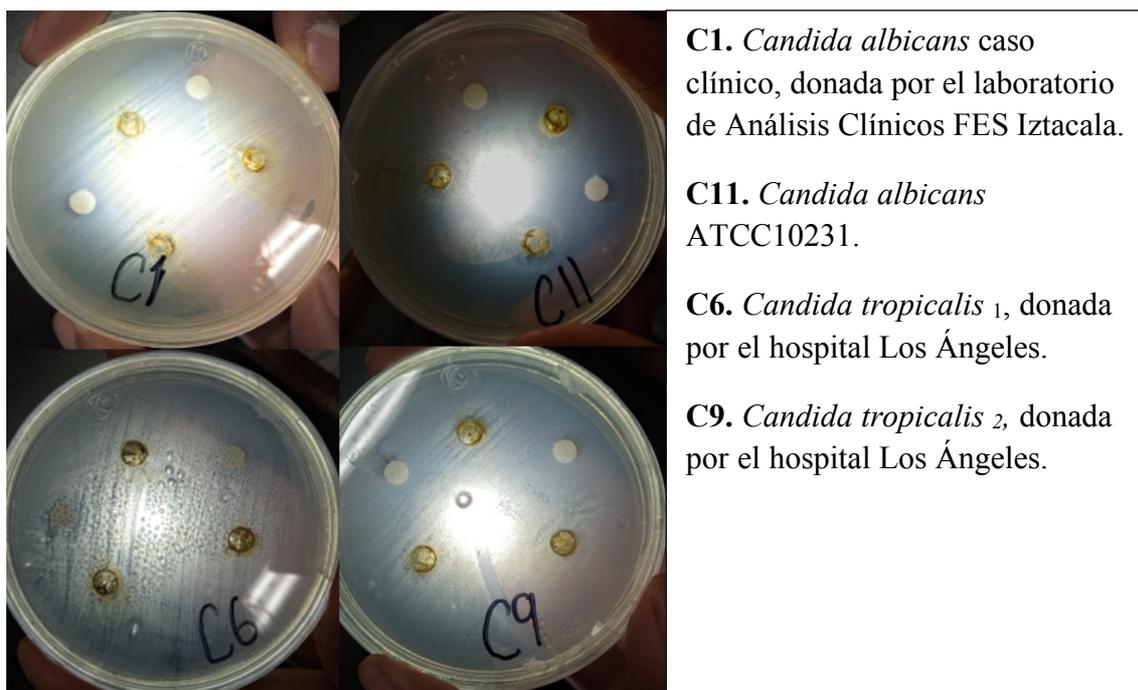
Figura 8. Actividad antibacteriana de miel de *Scaptotrigona mexicana* sobre bacterias Gram positivas(+) y Gram negativas(-) de interés clínico. **DC** Disminución del crecimiento, **IC** Inhibición del crecimiento.

Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica

La actividad antifúngica fue evaluada de manera cualitativa, colocando la miel directamente en los pozos del agar. Presentó actividad sobre *Candida albicans* ATCC10231, cepa en la que hubo inhibición del crecimiento, cabe destacar que el halo de inhibición formado por la miel fue de mayor tamaño que el formado por la nistatina, que en este caso fungió como el control positivo. En la cepa de *Candida tropicalis* 2, donada por el hospital Los Ángeles, el efecto que tuvo la miel fue la disminución del crecimiento, más no presentó inhibición de este (Figura 9).

Por su parte, *Candida albicans* caso clínico y *Candida tropicalis* 1, donada por el hospital Los Ángeles no presentaron ningún efecto a causa de la miel de *Scaptotrigona mexicana*.

Los efectos que la miel tuvo sobre las diferentes cepas de hongos levaduriformes están reportados como el promedio de los halos formados en las 3 repeticiones realizadas por cada cepa y su desviación estándar asociada (Cuadro 7).



C1. *Candida albicans* caso clínico, donada por el laboratorio de Análisis Clínicos FES Iztacala.

C11. *Candida albicans* ATCC10231.

C6. *Candida tropicalis* 1, donada por el hospital Los Ángeles.

C9. *Candida tropicalis* 2, donada por el hospital Los Ángeles.

Figura 9. Halos de inhibición de la miel de *Scaptotrigona mexicana* y de nistatina (sensidiscos blancos 25µg) sobre hongos levaduriformes de interés clínico.

Cuadro 7. Efecto antifúngico de la miel de *Scaptotrigona mexicana* sobre hongos levaduriformes de interés clínico.

Cepa	Miel DC	Miel IC	Nistatina
<i>Candida albicans</i> caso clínico, donada por el laboratorio de Análisis Clínicos FES Iztacala	SE	SE	8.0±0.0
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	SE	12.0±0.0	8.0±0.0
<i>Candida tropicalis</i> 1, donada por el hospital Los Ángeles	SE	SE	9.0±1.73
<i>Candida tropicalis</i> 2, donada por el hospital Los Ángeles	14.0±0.0	SE	8.0±0.0

Longitud promedio de halos de inhibición reportados en mm con su respectiva desviación estándar. **SE** Sin efecto, **DC** Disminución del crecimiento, **IC** Inhibición del crecimiento.

DISCUSIÓN

En la actualidad, el uso de la miel de abejas de la Tribu Meliponini es principalmente medicinal (Dardón y Enríquez, 2008). Dentro de las abejas sin aguijón, la miel de *Scaptotrigona mexicana* es bien apreciada por su calidad, teniendo gran demanda en los mercados de alimentos orgánicos debido a las propiedades curativas que se le han atribuido (Arzaluz et al., 2002).

Para que la miel sea considerada de buena calidad, debe cumplir con ciertos parámetros fisicoquímicos y tener propiedades que coadyuven al combate de enfermedades o malestares, características que a la vez la catalogan como un producto nutracéutico. No obstante, se conoce que la composición de la miel depende principalmente de su fuente floral; además, también desempeñan un papel importante ciertos factores externos como los estacionales, ambientales y el procesamiento (Alvarez-Suárez et al., 2010). Todo esto se ve reflejado en una gama de variabilidad en la composición de las mieles, aun perteneciendo a la misma especie. Por lo tanto, en el presente estudio se evaluaron las propiedades nutracéuticas de una miel producida por *Scaptotrigona mexicana*, procedente de Papantla, Veracruz.

Entre las características organolépticas evaluadas, el color es especialmente importante desde el punto de vista comercial, ya que a nivel internacional las mieles son comercializadas según su color, teniendo un valor diferente en cada mercado. En Europa se privilegian las mieles más oscuras, con sabores más fuertes y tonos ámbar desde el claro hasta el oscuro (Delmoro et al., 2010). La miel evaluada posee esta característica con un color ámbar oscuro (Cuadro 3) correspondiente a 150 mm Pfund, coincidiendo con el color oscuro reportado en otro estudio de miel perteneciente a la misma especie (Jimenez et al., 2016); no obstante, esta característica es variable, ya que para las mieles de *Scaptotrigona limae* y *Scaptotrigona sp* nativas de Colombia, se determinaron valores de 54 y 70 mm Pfund respectivamente (Fuenmayor et al., 2013), presentando coloraciones más claras.

Los pigmentos naturales presentes en la miel son fundamentalmente carotenos y flavonoides (Ciappini et al., 2013), carotenoides, clorofila y xantofila (Suescún y Vit, 2008); el color de la miel es uno de los atributos de mayor variabilidad y depende de varios factores, fundamentalmente está relacionado con el origen botánico y la composición del néctar y con el proceso de obtención, la temperatura y el tiempo de

almacenamiento (Salas et al., 1993), se asocia también al contenido de minerales, polen y compuestos fenólicos (Ulloa et al., 2010). El color ámbar de la miel es proporcionado principalmente por compuestos fenólicos y productos de reacción de Maillard (Belitz et al., 2004), así como una miel oscura generalmente tiene un mayor contenido de cenizas (Alves et al., 2013).

Por su parte, el sabor y olor en la miel también son características variables, pero generalmente responden al recurso floral del que la abeja productora ha libado néctar (Suescún y Vit, 2008; Bertoneclj et al., 2007). Se determinó un sabor agridulce y un olor cítrico en la miel caracterizada (Cuadro 3). Entre los componentes volátiles comunes que otorgan olor a la miel, destacan sobre todo compuestos carbonílicos; aldehídos como el fenilacetaldehído, el benzaldehído, el hexanal y el octanal; cetonas como la acetona, la 2-butanona, la 2,3-butanodiona y la 2- y 3-pentanona; alcoholes como el etanol y el alcohol bencílico y ésteres, como los formiatos de metilo y etilo y el acetato de etilo (Soria et al., 2002).

La humedad presente en la muestra de miel fue de 25.4% (Cuadro 4), coincidiendo casi por completo con la humedad de 25.8% presente en la miel de *Scaptotrigona limae* (Fuenmayor et al., 2013). Al mismo tiempo, este porcentaje de humedad es muy cercano al 23.1% reportado para miel de *Scaptotrigona mexicana* procedente del sur de Chiapas (Grajales-Conesa et al., 2018), así como al encontrado por Jimenez et al. 2016, quienes evaluaron las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de miel de esta misma especie, cosechadas en diferentes años, reportando que las mieles evaluadas poseen un rango de humedad de 20.61 a 28.04%. Estos valores superan lo indicado en la Norma Oficial Mexicana NOM-004-SAG/GAN-2018, que establece un contenido de humedad máximo de 20% para la miel de *A. mellifera*. Sin embargo, en una revisión de literatura científica realizada por Moo-Huchin et al. 2015, sobre la composición química de la miel producida por diferentes especies de abejas sin aguijón en diversos países, encuentran que la humedad presente en ellas siempre supera el valor máximo establecido, por lo que sugieren un valor máximo de 30% para la miel de estas abejas. Así mismo, en la evaluación realizada a estudios hechos desde 1964 sobre la composición de 152 mieles de abejas sin aguijón, Souza et al. 2006, reportan un rango de humedad de 19.9 a 41.9% para la miel de esta tribu. De hecho, las mieles de abejas sin aguijón se pueden distinguir de las mieles de *Apis mellifera* por su contenido de agua promedio siempre más alto

(Guerrini et al., 2009). Esta característica puede deberse a que las especies de abejas sin aguijón saquean tanto las flores como los frutos maduros, teniendo estos últimos un mayor contenido de agua (Guerrini et al., 2009; Vit et al., 1994).

El contenido de agua de las mieles depende de las condiciones climáticas, la temporada de cosecha, la estación, la humedad original del néctar y del grado de maduración alcanzado en la colmena (Alves et al., 2013). Un alto contenido de humedad conlleva un alto riesgo de fermentación y con ello, la posterior alteración de factores organolépticos, características fisicoquímicas, químicas y funcionales de la miel (Guerrini et al., 2009), no obstante, la miel de abejas sin aguijón es bastante resistente a sufrir fermentación; esto se asocia a la presencia de compuestos polifenólicos derivados de la flora pecoreada y a que las resinas en el cerumen utilizado para construir los potes de almacenamiento podrían estar presentes en la miel, funcionando como agentes biocidas, evitando la presencia de microorganismos que la produzcan (Guerrini et al., 2009; Vit et al., 1994).

La humedad en la miel evaluada se encuentra directamente relacionada con la consistencia encontrada, ya que el alto nivel de agua presente en la muestra confiere una consistencia fluida a la miel, confirmado a la vez por la baja densidad, con un valor de 1.423 g/mL (Cuadro 4). Se reporta un rango de densidad de 1.10 a 1.32 g/mL en las mieles de *Scaptotrigona mexicana* evaluadas por Jimenez et al. 2016, valores muy cercanos al determinado en la miel evaluada en este estudio.

El pH es un parámetro importante que evaluar durante la obtención y almacenamiento de los alimentos por su influencia sobre el desarrollo de microorganismos y enzimas (Zandalema, 2008). La miel posee un pH bajo, principalmente debido a la conversión de glucosa en peróxido de hidrógeno y ácido glucónico, acción realizada por la enzima glucosa oxidasa (Kwakman et al., 2010). El caso de la miel evaluada en este estudio no es la excepción, con un pH igual a 3.78 (Cuadro 4), cercano al pH de 4.04 reportado para la miel estudiada por Dardón y Enríquez 2008 en Guatemala, y aún más aproximado a los valores de pH presentes en las mieles evaluadas por Jimenez et al. 2016 en Veracruz, con un rango de 3.5 a 3.82, así como el de la miel caracterizada por Grajales-Conesa et al. 2018, en Chiapas, con un pH de 3.65, todas producidas por *Scaptotrigona mexicana*, misma especie productora de la miel estudiada en este trabajo.

Al mismo tiempo, el pH está asociado a la presencia de ácidos orgánicos, los cuales se obtienen directamente del néctar, o bien, se derivan de azúcares por efecto de las enzimas secretadas por las abejas cuando transforman el néctar en miel (Cherchi et al., 1994). Este es el caso del ácido glucónico mencionado con anterioridad, quien también tiene un origen bacteriano, ya que algunas bacterias del género *Gluconobacter* alojadas en el intestino de las abejas y presentes en miel en proceso de maduración, lo producen en grandes cantidades bajo concentraciones elevadas de glucosa y ambientes aerobios (Ruiz-Argüeso et al., 1973). A pesar de presentarse en pequeñas cantidades (<0.5%), los ácidos orgánicos contribuyen a las actividades antibacterianas y antioxidantes de la miel (Mato et al., 2006).

La NOM-004-SAG/GAN-2018, establece un máximo de 50 mili-equivalentes de ácido/Kg. La cantidad de ácidos orgánicos presentes en la miel evaluada fue de 14.1 meq AO/Kg, por lo cual cumple con este parámetro de calidad. A pesar de ello, al parecer es una cantidad baja si se compara con la miel mexicana de la misma especie, evaluada por Jimenez et al. 2016, en la que la acidez total de la miel varió de 32.90 a 35.10 meq /Kg. Por el contrario, en una miel producida también por *Scaptotrigona mexicana* en Guatemala, la acidez libre es de 12.68 meq/Kg (Dardón y Enríquez, 2008), valor cercano al encontrado en este estudio.

Los carbohidratos son el constituyente mayoritario de cualquier miel, representando alrededor del 80% de su peso seco y por ello determinan en gran medida muchas de sus características, tales como como higroscopicidad, viscosidad y valor energético (Sescún y Vit, 2008). En el caso de la miel evaluada, se encontró un 73.1% de azúcares totales, valor determinado por medio de la medición de grados Brix, mismo método empleado por Roubik 1983, quien reporta un valor muy cercano al obtenido en este estudio, con un rango de 55 a 75 grados Brix y, por ende, azúcares totales para miel de diversas especies del género *Melipona* originarias de Panamá.

De los azúcares totales, se determinó un 47.3% correspondiente a fructosa y 25.8% a glucosa. En una evaluación electroquímica de las características de calidad en la miel de la tribu Meliponini y *Apis mellifera*, Reyes-Salas et al. 2014, reportan un contenido de 45.34% de fructosa para una de las mieles de la tribu evaluadas, valor muy cercano al encontrado en este estudio; por otro lado, en una evaluación de parámetros físicoquímicos de miel del género *Melipona* en el Amazonas, Almeida-Muradian et al.

2007, determinaron un contenido de glucosa de 28.59 a 29.80%, valores del mismo modo muy cercanos al de la miel evaluada en este estudio.

Finalmente, se determinó un contenido de 35.84% azúcares reductores en la miel evaluada, lo cual resulta un porcentaje bajo respecto a otros estudios realizados en miel de la misma especie. Entre las mieles de meliponinos producidas en Guatemala y caracterizadas por Dardón y Enríquez 2008, la miel de *Scaptotrigona mexicana* tuvo un 57.22% de azúcares reductores; por otra parte, las mieles de *S. mexicana* producidas en México y caracterizadas por Jimenez et al. 2016, presentaron un rango de 52.57 a 59.16%. Sin embargo, en la evaluación de propiedades nutraceuticas de miel de *Melipona* procedente de Mérida, Yucatán, Monter 2018, reporta un contenido de 22.77%, el cual es más próximo al contenido determinado en este estudio. Cabe mencionar que la NOM-004-SAG/GAN-2018, establece un contenido mínimo de 60% de azúcares reductores, por lo que la miel evaluada no cumple con este criterio, sin embargo, esta norma ha sido elaborada para miel de *Apis mellifera*, lo que destaca la importancia de elaborar una norma adecuada a las características de la miel de abejas meliponas.

Otro de los componentes que conforman la miel son las proteínas. Para la miel evaluada se determinó un contenido de 0.540 mg/g, representando el 0.054% de su composición. Al parecer la cantidad de proteínas en la miel de *Scaptotrigona mexicana* evaluada en este estudio es alta, ya que en una caracterización de las propiedades de la miel de diez especies peruanas de abejas sin aguijón realizada por Rodríguez-Malaver et al. 2009, se determinó un contenido de 1.57 mg de proteínas en 100 gramos de miel, es decir, 0.0157 mg/g para *Scaptotrigona polystica*; en otra evaluación de la composición de miel de abejas sin aguijón en Venezuela, para un grupo de mieles entre las que se encontraba *Scaptotrigona aff depilis*, Vit et al. 1994, reportan un contenido de 175.80 mg de nitrógeno en 100 gramos de miel, es decir, 0.175 mg/g, equivalente al contenido de proteínas.

El contenido de proteínas en la miel puede atribuirse a la presencia de aminoácidos libres y enzimas, de las cuales algunas son adicionadas por las glándulas salivares o la faringe de las abejas y otras derivan directamente del néctar; sin embargo, la principal fuente de proteínas en la miel es el polen (Saxena et al., 2010; da Silva et al., 2016), por lo que es de esperarse que el origen botánico de la misma sea un factor de gran influencia en el contenido de estas biomoléculas.

El aminoácido más abundante en la miel es la prolina, originado principalmente por las secreciones salivares de las abejas durante el procesamiento del néctar para su transformación en miel (da Silva et al., 2016). Entre las enzimas de mayor importancia se encuentran la diastasa e invertasa. La diastasa se presenta naturalmente en la miel y su actividad tiende a reducirse con el paso del tiempo, por lo que es utilizada para determinar la frescura de la misma (Nordin et al., 2018). Las diastasas α y β amilasa, hidrolizan las cadenas de almidón produciendo dextrina y maltosa respectivamente (Sak-Bosnar y Sakač, 2012). Por su parte, la invertasa hidroliza la sacarosa en el néctar para transformarla en fructosa y glucosa (Vit y Pulcini, 1996).

La actividad antioxidante que posee la miel natural depende principalmente de su origen botánico y es conferida debido a moléculas que forman parte de su composición química, como compuestos fenólicos, flavonoides, enzimas, ácidos orgánicos, aminoácidos, carotenoides y ácido ascórbico (Meda et al., 2005). El ácido ascórbico es el antioxidante de fase acuosa más eficaz en el plasma sanguíneo humano y se sugiere que es un antioxidante fisiológico de gran importancia para la protección contra enfermedades y procesos degenerativos causados por el estrés oxidativo (Frei et al., 1989); su presencia se puede aumentar fácilmente por medio de suplementos alimenticios.

En una evaluación de las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de la miel de dos abejas sin aguijón en Nigeria, realizada por Nweze et al. 2017, se encontró un contenido de 162.01 a 169.27 mg/Kg de ácido ascórbico para *Hypotrigona* sp. y de 144.31 a 151.62 mg/Kg para *Melipona* sp. Estos valores concuerdan con los determinados en la miel de *Scaptotrigona mexicana* evaluada en este estudio, en la cual el ácido ascórbico se encuentra en una cantidad de 0.149 mg/g, lo que, expresado en los mismos términos utilizados en el antecedente mencionado, equivale a 149 mg/Kg, teniendo una mayor proximidad a los reportados para *Melipona* sp. No obstante, la miel evaluada tiene un contenido bajo de ácido ascórbico si se compara con el reportado por Jimenez et al. 2016 para mieles de la misma especie, que va de 280 a 390 mg/Kg. Estas diferencias pueden ser atribuidas al recurso floral del que las mieles provienen. En la miel evaluada por Jimenez et al., 2016, si bien no se especifica la región geográfica a la que pertenece, mencionan que es una región productora de naranjas, por lo que muy probablemente fueron una de las principales fuentes de néctar para las abejas, lo cual explicaría el alto

contenido de ácido ascórbico presente en la miel, ya que se sabe que las especies botánicas cítricas son una fuente rica de fitoquímicos útiles como la vitamina C (Zou et al., 2016).

La composición fenólica en la miel también depende principalmente de su origen floral; los compuestos fenólicos son a menudo el producto del metabolismo secundario de las plantas y se caracterizan por la presencia de múltiples grupos fenólicos que están asociados con estructuras más o menos complejas (Cianciosi et al., 2018). Estos compuestos han sido reconocidos como los principales responsables de la actividad antioxidante de la miel, asociada principalmente con la capacidad de eliminar radicales libres, mediante la formación de moléculas más estables y menos tóxicas. Los compuestos fenólicos estabilizan los radicales libres cuando donan hidrógeno de uno de sus grupos hidroxilo; el grado de actividad está relacionado con el número de sus grupos hidroxilo (Moniruzzaman et al., 2014).

En una caracterización de las propiedades de la miel de diez especies peruanas de abejas sin aguijón realizada por Rodríguez-Malaver et al. 2009, se determinó un contenido de 337 mg de fenoles en 100 gramos de miel, es decir, 3.37 mg/g para *Scaptotrigona polystica*; cantidad aproximadamente tres veces mayor que el contenido de fenoles presentes en la miel evaluada en este estudio el cual fue de 1.146 mg/g. Por otra parte, en la evaluación de las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de mieles de *Scaptotrigona mexicana* realizada en México por Jimenez et al. 2016, se reporta un contenido más bajo de estos compuestos, que va de 25.85 a 40.1 mg de fenoles en 100 gramos de miel, es decir, 0.258 a 0.401 mg eAG/g. El encontrar esta variabilidad aun dentro de mieles pertenecientes al mismo género e incluso la misma especie de abeja productora pone en evidencia la influencia de otros factores tales como el origen floral y geográfico de la miel.

Así mismo, se realizó una Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos (HPLC-DAD) (Figura 6), a fin de conocer la composición química de la miel evaluada tras someterla a una digestión química por hidrólisis ácida. Debido a que no hubo coincidencias con la base de datos del equipo empleado, los compuestos presentes sólo pudieron ser determinados a nivel de grupo, encontrando fenoles en su totalidad (Cuadro 5); sin embargo, existen estudios en los que se ha determinado la composición fenólica de diversas mieles producidas por abejas sin aguijón, en los que se reportan ácido salicílico, ácido p-cumárico, naringina, taxifolina, ácido protocatecuico,

ácido cafeico, ácido rosmarínico, ácido mandélico, ácido clorogénico, ácido gálico, catecol, vainillina, entre otros (da Silva et al., 2013; Biluca et al., 2017; Biluca et al., 2020).

Parte de los polifenoles presentes en la miel está representada por los flavonoides, estos son compuestos de bajo peso molecular, principalmente solubles en agua, que son componentes vitales para el aroma y las propiedades antioxidantes de la miel (Khalil et al., 2012). La actividad antioxidante de los flavonoides en la mayoría de los casos depende del número y la posición de los grupos hidroxilo y otros sustituyentes y la glucosilación de las moléculas flavonoides (da Silva et al., 2016). Estas moléculas se clasifican según el grado de oxidación del anillo C, siendo las flavanonas, flavononas y flavonoles los más abundantes en la miel (Ciappini et al., 2013). En miel de abejas sin aguijón, se han reportado flavonoides como luteolina, quercetina e isoramnetina (Guerrini et al., 2009).

Nweze et al. 2017, realizaron la evaluación de las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de la miel de dos abejas sin aguijón en Nigeria, en la que encontraron un contenido de 28.19 a 52.52 mg/Kg de flavonoides para *Hypotrigona sp.* y de 82.78 a 92.60 mg/Kg para *Melipona sp.* Por su parte, la miel de *Scaptorigona mexicana* evaluada en este estudio, tuvo un contenido de flavonoides de 0.00856 mg eQ/g, es decir, 8.56 mg/kg, el cual es contenido bastante bajo de estos compuestos. Se cree que los flavonoides en la miel se derivan parcialmente de los flavonoides presentes en el polen (Anklam, 1998), por lo que su origen botánico puede ser un factor determinante en el contenido de estos compuestos. Aunado a ello, es importante considerar que las mieles pertenecen a ubicaciones geográficas distintas, por lo que además de seguramente tener un origen botánico diferente, las plantas que fueron recursos florales estuvieron sometidas a diferentes presiones ambientales. Nigeria es un país ubicado muy cerca del Ecuador, por lo que la radiación solar es más directa e intensa que la incidente en México, lo cual puede estar teniendo influencia en un mayor contenido de flavonoides, ya que a las flavanonas y flavonoles que son de los flavonoides más abundantes en la miel, se les han atribuido funciones como la protección de las plantas contra la radiación UV (McClure, 1975).

El estrés oxidativo puede definirse como un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, y puede afectar diversas funciones fisiológicas. Los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno son los principales agentes

oxidantes en los sistemas celulares, y están involucrados en el envejecimiento y en la aparición de muchos tipos de enfermedades, como procesos inflamatorios, diabetes, cáncer, trastornos cardiovasculares y neurodegenerativos (Rahal et al., 2014).

La ingesta de compuestos antioxidantes a través de la dieta puede contrarrestar el efecto de moléculas oxidantes, reduciendo el estrés oxidativo; la capacidad antioxidante se considera un indicador de la presencia de compuestos bioactivos en la miel (Cianciosi et al., 2018), moléculas como las anteriormente mencionadas, que pueden donar un electrón a los radicales libres, neutralizando, disminuyendo o eliminando su capacidad de dañar las células y las principales biomoléculas, como los ácidos nucleicos, las proteínas y los lípidos (Lobo et al., 2010).

La capacidad antioxidante de la miel evaluada en este estudio fue alta comparada con lo encontrado para la misma especie en otros estudios. Para este ensayo se utilizó el extracto de flavonoides obtenido de la miel mediante hidrólisis ácida y se evaluó su capacidad antioxidante mediante la reducción del radical DPPH, obteniendo un porcentaje de reducción promedio de 28.46%. Este mismo método fue utilizado por Jimenez et al. 2016, en la caracterización fisicoquímica de mieles de *Scaptotrigona mexicana*, en la cual reportan un porcentaje de reducción con un rango de 15.00 a 19.04%.

El uso de la miel como un agente antibacteriano se conoce desde la antigüedad y fue una práctica utilizada durante miles de años, pero su uso se vio disminuido a causa de su reemplazamiento por antibióticos. Sin embargo, en la actualidad comienza a retomar fuerza debido a diversos factores, como la resistencia que algunas bacterias han desarrollado ante diversos antibióticos empleados, lo cual lleva a la búsqueda de alternativas naturales, como lo es la miel (Molan et al., 1988).

La actividad antibacteriana de la miel se ha atribuido a un conjunto de propiedades fisicoquímicas que la caracterizan, de las cuales varias se han tocado ya en este escrito. Una de ellas es su alta osmolaridad, que ejerce efectos osmóticos sobre los microorganismos, por lo cual el agua sale de ellos, reduciendo su capacidad de supervivencia; por otra parte, su acidez, debido a sus bajos rangos de pH inhibe el crecimiento de muchos patógenos, cuyo pH óptimo de crecimiento no es ácido; además, la presencia de peróxido de hidrógeno, ésta por acción de la glucosa oxidasa, una enzima

producida por la glándula hipofaríngea de las abejas y, finalmente, compuestos como ácidos orgánicos, fenoles y flavonoides (Molan, 2001; Garedew et al., 2003).

En este estudio la actividad antibacteriana se evaluó ante las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*; y las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. *Staphylococcus aureus* es una bacteria comensal y un patógeno humano. Aproximadamente el 30% de la población humana está colonizada por *S. aureus*; simultáneamente, es una de las principales causas de bacteriemia y endocarditis infecciosa, así como de infecciones osteoarticulares, cutáneas y de tejidos blandos, pleuropulmonares y asociadas con dispositivos (Tong et al., 2015), compartiendo este último tipo de infección con *S. epidermidis*.

S. epidermidis se encuentra de manera natural en la microbiota de la piel humana y es la especie de estafilococo más común aislada de sitios cutáneos. La mayor parte de las infecciones por *S. epidermidis* se adquieren en hospitales, siendo una causa habitual de infecciones que implican dispositivos extraños permanentes y de heridas quirúrgicas, así como de bacteriemia en pacientes inmunodeprimidos (Lowy et al., 1983; Blum y Rodvold, 1987).

Por otra parte, *Escherichia coli* es el principal anaerobio facultativo presente en la microbiota del intestino humano. Su presencia es inocua mientras permanece recluida a la luz intestinal, no obstante, si el huésped se encuentra débil, inmunodeprimido, o si logran traspasar las barreras gastrointestinales, incluso las cepas habituales pueden causar infección. Además, algunas cepas han desarrollado la capacidad de causar enfermedades del sistema nervioso central, urinario y gastrointestinal, representando en este último caso la causa más común de diarrea pediátrica a nivel mundial (Nataro y Kaper, 1998).

Finalmente, *Pseudomonas aeruginosa* es el principal patógeno oportunista causante de queratitis ulcerosa, otitis externa, infecciones en quemaduras y neumonías tanto comunes como nosocomiales, afectando principalmente a personas inmunodeprimidas, hospitalizadas o con fibrosis quística. Además de ser comunes, las infecciones ocasionadas por esta bacteria han sido asociadas con una alta morbilidad y mortalidad en comparación con otros patógenos bacterianos (Driscoll et al., 2007; Yetkin et al., 2006).

La miel de *Scaptotrigona mexicana* fue efectiva ante todas las cepas probadas, causando en tres de las cuatro cepas tanto disminución como inhibición del crecimiento, siendo esta inhibición mayor a la causada por cloranfenicol, antibiótico utilizado como control positivo (Figura 7 y 8, Cuadro 6); este resultado es muy relevante, ya que el cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro y cuya actividad ya está probada (Morales et al., 2007), por lo que resulta muy prometedor que la miel presente una actividad antibacteriana mucho mayor que la de un compuesto purificado.

La mayor actividad se presentó en *Staphylococcus epidermidis* (Figura 8). La excepción fue *Staphylococcus aureus*, en la que sólo se presentó inhibición del crecimiento (12.66 ± 3.21) y esta inhibición fue ligeramente menor a la ejercida por el cloranfenicol (15.5 ± 0.70), sin embargo, sigue siendo una actividad importante ya que casi equipara el efecto de un compuesto puro.

En un estudio comparativo de la actividad antibacteriana de la miel de la abeja sin aguijón *Meliponula boncadei* y la de antibióticos estándar utilizados, empleando la miel pura directamente y el método de difusión en agar, tal como se realizó en este estudio, Kwapong et al. 2013, encontraron que la miel tuvo una mayor actividad antibacteriana que los ocho antibióticos sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*, coincidiendo con lo encontrado en este estudio para *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Cuadro 6, Figura 8).

En la evaluación de la actividad antimicrobiana de miel de *Apis mellifera*, *Melipona beecheii* y *Scaptotrigona pectoralis*, realizada por Catzín-Ventura et al. 2009, sobre bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, las mieles de las dos abejas nativas tuvieron una mayor inhibición que la miel de *A. mellifera*, siendo *Escherichia coli* la bacteria sobre la que se tuvo menor efecto, coincidiendo con el presente estudio (Figura 8).

En la evaluación de la actividad antibacteriana de miel de *Scaptotrigona mexicana*, realizada por Jimenez et al. 2016, se encontró actividad sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, con una concentración mínima inhibitoria menor para *S. aureus* que para *P. aeruginosa* y *E. coli*.

Por último, la actividad antimicrobiana de miel de *Scaptotrigona mexicana*, producida en la sierra nororiental de Puebla mostró actividad ante *Staphylococcus aureus*

y *Pseudomonas aeruginosa* y una actividad mínima ante *Escherichia coli* (García-Guerra et al., 2009), sin embargo, los halos de inhibición reportados en dicho estudio son mucho menores a los encontrados en la miel evaluada en este trabajo, a pesar de tratarse de miel producida por la misma especie, pero en diferente región, perteneciendo ésta a Papantla, Veracruz. Estas diferencias pueden deberse a que las características fisicoquímicas de la miel que le confieren dicha actividad antibacteriana, dependen de su origen botánico y geográfico.

La actividad antibacteriana presentada por la miel de *S. mexicana* evaluada en este estudio, además de factores como la osmolaridad, el pH y la presencia de peróxido de hidrógeno, puede atribuirse también a la presencia de fenoles dentro de su composición química. El número y sitio de grupos hidroxilo que presentan determina su toxicidad, siendo mayor entre más hidroxilación exista (Geissman, 1963), algunos autores reportan que una mayor oxidación resulta en más inhibición (Scalbert, 1991; Urs y Dunleavy, 1975). El mecanismo de toxicidad ante los microorganismos consiste en la inhibición de enzimas por acción de los compuestos oxidados (Mason y Wasserman, 1987).

Se ha registrado la actividad antibacteriana de ácido gálico ante *Staphylococcus aureus* (Chanwitheesuk et al., 2007), *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli*, así como su potencial para inhibir la motilidad bacteriana y prevenir y controlar las biopelículas de estos patógenos (Borges et al., 2012). Del mismo modo, se ha reportado la capacidad del ácido caféico y el ácido p-cumárico para inhibir el crecimiento de bacterias como *S. aureus* y *E. coli* (Campos et al., 2003).

Un posible mecanismo para explicar la acción antimicrobiana de los ácidos fenólicos es la hiperacidificación en la interfaz de la membrana plasmática como consecuencia de su disociación. Dicha hiperacidificación provocaría alteraciones en el potencial de membrana, haciéndola más permeable, además de afectar la bomba de ATPasa sodio-potasio implicada en la síntesis de ATP (Vattem et al., 2005).

Se ha demostrado también el efecto antibacteriano de la naringina, flavonoide recurrentemente presente en miel de abejas sin aguijón, inhibiendo el crecimiento de *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Tsui et al., 2008), así como la actividad antibacteriana de la quercetina sobre *S. aureus*, *S. epidermidis* y moderada sobre *E. coli* y *P. aeruginosa* (Rahua et al., 2000).

Respecto a hongos levaduriformes, las levaduras del género *Candida* son las encontradas con mayor frecuencia en el microbioma humano, localizándose en las mucosas de los tractos respiratorio superior, gástrico y genital femenino (Singh y Raksha, 2013); las especies de este género poseen características que les permiten adaptarse a diferentes entornos, por lo que actúan como un patógeno oportunista, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos, ocasionando infecciones conocidas comúnmente como candidiasis (Cortés y Corrales, 2018). La candidiasis es la enfermedad fúngica más frecuente en el ser humano y puede causar enfermedades sistémicas tanto superficiales como graves, invadiendo órganos profundos y el torrente sanguíneo (Singh y Raksha, 2013).

Es por ello que la miel evaluada en este estudio se probó ante las especies *Candida albicans* y *Candida tropicalis*; en las cuales tuvo efecto inhibitorio sólo sobre la cepa de *Candida albicans* ATCC10231 (12.0 ± 0.0), pero dicho efecto fue mayor que el provocado por el control positivo, en este caso nistatina (8.0 ± 0.0).

Entre las mieles de meliponinos producidas en Guatemala y caracterizadas por Dardón y Enríquez 2008, la miel de *Scaptotrigona mexicana* tuvo efecto inhibitorio sobre *Candida albicans* a una concentración del 5%; por el contrario, en la evaluación de la actividad antimicrobiana de miel de *Scaptotrigona mexicana* realizada en México por Jimenez et al. 2016, no hubo efecto sobre *C. albicans*, reportándola como resistente.

Se ha reportado la actividad anti-candida de compuestos fenólicos como el ácido caféico, ácido clorogénico, ácido gálico (Özçelik et al., 2011), ácido salicílico y p-cumárico (Faria et al., 2011), así como de quercetina y naringina (Kurşat et al., 2011; Tsui et al., 2008); por lo que las diferencias de actividad de la miel sobre *Candida* podría estar respondiendo a la presencia o la ausencia de dichos compuestos en las mieles, así como a una mayor o menor concentración de los mismos.

Al tener efecto inhibitorio sólo sobre la cepa de *Candida albicans* y una disminución del crecimiento sobre *C. tropicalis*, se sugiere que, si bien la miel evaluada en este estudio no parece tener potencial para ser un tratamiento aplicable a infecciones por hongos levaduriformes, se puede utilizar como un suplemento preventivo.

La marcada actividad antibacteriana y la poca actividad antifúngica presentadas por la miel de *S. mexicana* se pueden explicar a través de diferencias estructurales entre

bacterias y levaduras. La bacteria *S. epidermidis* (Gram-positiva) sobre la que se tuvo el mayor efecto carece de membrana externa, lo que facilita la difusión de los compuestos fenólicos a través de la pared celular. *S. aureus* (Gram-positiva) sobre la que se presentó el menor efecto antibacteriano a pesar de carecer de membrana externa, presenta diversos mecanismos de defensa, destacando la formación de bombas activas que bombean toxinas fuera de la célula, la disminución de la permeabilidad membranal después de la exposición a un compuesto tóxico y la producción de enzimas inactivantes (Iyobe, 1997; Elliot, 1999). Finalmente, *C. albicans* tiene una pared celular que consta de glucanos, quitina y proteínas (Chaffin, 2008), que proporcionan una barrera de mayor protección contra la acción de dichos compuestos (Papadopoulou et al., 2005).

CONCLUSIONES

Dadas sus características organolépticas y químicas, así como su capacidad antioxidante y su actividad antimicrobiana, la miel de *Scaptotrigona mexicana* es un producto nutracéutico.

La miel de *Scaptotrigona mexicana* presenta características organolépticas y químicas propias.

La miel de *Scaptotrigona mexicana* posee capacidad antioxidante.

La miel de *Scaptotrigona mexicana* ejerce actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas de interés clínico.

Se sugiere el uso de miel de *Scaptotrigona mexicana* como suplemento preventivo para infecciones por hongos levaduriformes.

LITERATURA CITADA

- Almeida-Muradian, L.B., Matsuda-Hitomi, A., Bastos-Markowicz, D.H. (2007). Physicochemical parameters of Amazon *Melipona* honey. *Química Nova*, 30(3), 707-708.
- Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Diaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., Battino, M. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), 2490–2499.
- Alves, A., Ramos, A., Goncalves, M. M., Bernardo, M., Mendes, B. (2013). Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30(2), 130–138.
- Arnold, N., Ayala, R., Mérida, J., Sagot, P., Aldasoro, M., Rémy, V. (2018). Registros nuevos de abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) para los estados de Chiapas y Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 89(3), 651-665.
- Arnold, N. (2018). Biología de las abejas sin aguijón. En: Arnold, N., Zepeda, R., Vásquez, M., Aldasoro, *Las abejas sin aguijón y su cultivo en Oaxaca, México con catálogo de especies* (pp.10-18). México: ECOSUR, CONABIO.
- Arzaluz, G. A., Obregon, H. F., Jones, R. W. (2002). Optimum brood size for artificial propagation of the stingless bee, *Scaptotrigona mexicana*. *Journal of Apicultural Research*, 41(1-2), 62–63.
- Ayala, R., (1999). Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Folia Entomología Mexicana*, 106(1), 123.
- Ayala, R., González, V., Engel, M. (2013). Mexican stingless bees (Hymenoptera: Apidae): diversity, distribution, and indigenous knowledge. En: Vit, P., Pedro, S., Roubik, D. (Ed.), *Pot-Honey: A legacy of stingless bees*, (pp. 135-152), New York: Springer.
- Baltrušaitytė, V., Venskutonis, P.R., Čeksterytė, V. (2007). Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food chemistry*, 101(2), 502-514.

- Belitz, H.D., W. Grosch, P. Schieberle. 2004. Sugars, sugar alcohols and honey. *Food Chemistry*. 888–889.
- Bertoncelj, J., Dobersek, U., Jamnik, M., Golob, T. (2007). Evaluation of phenolic content, antioxidant activity and color of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 105(2), 822-828.
- Biluca, F.C., da Silva, B., Caon, T., Mohr, E.T.B., Vieira, G.N., Gonzaga, L.V., Vitali, L., Micke, G., Fett, R., Dalmarco, E.M., Oliveira, A.C.C. (2020). Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (Meliponinae). *Food Research International*, 129, 108756.
- Biluca, F.C., de Gois, J.S., Schulz, M., Braghini, F., Gonzaga, L.V., Maltez, H.F., Rodrigues, E., Vitali, L., Micke, G.A., Borges, D.L.G., Oliveira, C.A.C., Fett, R. (2017). Phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (Meliponinae). *Journal of Food Composition and Analysis*, 63, 89-97.
- Biruete-Guzmán, A., Juárez-Hernández, E., Sieiro-Ortega, E., Romero-Viruegas, R., Silencio-Barrita, J. L. (2009). Los nutracéuticos. Lo que es conveniente saber. *Revista Mexicana de Pediatría*, 76(3), 136-145.
- Blum, R. A., Rodvold, K. A. (1987). Recognition and importance of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Clinical pharmacy*, 6(6), 464-475.
- Borges, A., Saavedra, MJ, Simões, M. (2012). La actividad de los ácidos ferúlico y gálico en la prevención de biopelículas y el control de bacterias patógenas. *Biofouling*, 28 (7), 755-767.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254.
- Brosi, B.J. (2009). The complex responses of social stingless bees (Apidae: Meliponini) to tropical deforestation. *Forest Ecology and Management*, 258(9), 1830-1837.
- Campos FM, Couto JA, Hogg TA. (2003). Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Journal of Applied Microbiology*, 94,167–74.

- Catzín-Ventura, G.A., Alfaro-Bates, R., Medina-Medina, L.A., Delgado-Herrera, M.A. (2009). Actividad Antimicrobiana y Origen Botánico en Mieles de *Melipona beecheii*, *Scaptotrigona pectoralis* y *Apis mellifera* del Estado de Yucatán. *Memorias VI congreso mesoamericano sobre abejas nativas*, 86-92.
- Cauich-Kumul, R., Ruiz-Ruiz, J.C., Ortiz-Vázquez, E., Campos, S., Rubi, M. (2015). Potencial antioxidante de la miel de *Melipona beecheii* y su relación con la salud: una revisión. *Nutrición Hospitalaria*, 32(4), 1432-1442.
- Chaffin, W.L. (2008). *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72, 495-544.
- Chang, R. (2002). *Química*. McGraw-Hill. (7ª ed.). México. 926p.
- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Kilburn, J. D., Rakariyatham, N. (2007). Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food chemistry*, 100(3), 1044-1048.
- Cherchi, A., Spanedda, L., Tuberoso, C., Cabras, P. (1994). Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of organic acids in honey. *Journal of Chromatography A*, 669(1-2), 59-64.
- Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T. Y., Afrin, S., Gasparrini, M., Reboredo-Rodriguez, P., Manna, P. P., Zhang, J., Bravo-Lamas, L., Martínez-Flórez S., Agudo-Toyos, P., Quiles, J.L., Giampieri, F., Battino, M. (2018). Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. *Molecules*, 23(9), 2322.
- Ciappini, M. C., Gatti, M. B., Di Vito, M. V. (2013). El Color como indicador del contenido de flavonoides en miel. *Revista Ciencia y Tecnología*. 15(19), 59-63.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2012). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. Tech. Rep. M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Pennsylvania, USA. 184p.
- Cortés, J.A., Corrales, I.F. (2018). Invasive candidiasis: epidemiology and risk factors. En: Silva, É., Moraes J.S. *Fungal Infection*. Colombia: IntechOpen.

- da Silva, I.A.A., da Silva, T.M.S., Camara, C.A., Queiroz, N., Magnani, M., de Novais, J.S., Soledade, L.E.B., Lima, E., de Souza, A.L., de Souza, A.G. (2013). Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food chemistry*, 141(4), 3552-3558.
- da Silva, P.M., Gauche, C., Gonzaga, L.V., Costa, A.C.O., Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309–323.
- Dardón, M.J., Enríquez, E. (2008). Caracterización físicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (Meliponini) de Guatemala. *Interciencia*, 33(12), 916-922.
- Delmoro, J., Muñoz, D., Nadal, V., Clementz, A., Pranzetti, V. (2010). El color en los alimentos: determinación de color en mieles. *Invenio: Revista de investigación académica*, 13(25), 145-152.
- Domínguez, A.X. (1973). *Métodos de investigación fitoquímica*. Limusa. México. 3-17.
- Driscoll, J. A., Brody, S. L., Kollef, M. H. (2007). The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, 67(3), 351-368.
- Elliott, T. S. J., Lambert, P. A. (1999). Antibacterial resistance in the intensive care unit: mechanisms and management. *British medical bulletin*, 55(1), 259-276.
- Faegri, K., Van Der Pijl, L. (2013). *Principles of pollination ecology*. England: Pergamon Press.
- Faria, N. C. G., Kim, J. H., Gonçalves, L. A. P., Martins, M. D. L., Chan, K. L., Campbell, B. C. (2011). Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. *Letters in applied microbiology*, 52(5), 506-513.
- Frei, B., England, L., Ames, B. N. (1989). Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16), 6377-6381.
- Fuenmayor, C. A., Díaz-Moreno, A. C., Zuluaga-Domínguez, C. M., Quicazán, M. C. (2013). Honey of Colombian Stingless Bees: Nutritional Characteristics and Physicochemical Quality Indicators. En: Vit, P., Pedro, S., Roubik, D. (Ed.), *Pot-Honey: A legacy of stingless bees*, (pp. 383-394), New York: Springer.

García-Flores, A., del Amo-Rodríguez, S., Hernández-Colorado, M.R. (2013). Taxkat, la abeja nativa de Mesoamérica. *La Ciencia y el Hombre*, 26(1).

García-Guerra, T.G., Albores-González, M.L., Durán-Olguín, L., López-García, A., Gonzáles-Salomé-F. (2009). Análisis Microbiológico y Actividad Antimicrobiana de Miel de *Scaptotrigona mexicana*, Producida en la Sierra Nororiental de Puebla, Comparando Cosechas de Diferentes Años. *Memorias VI congreso mesoamericano sobre abejas nativas*, 99-105.

Garedew, A., Schmolz, E., Lamprecht, I. (2003). The antimicrobial activity of honey of the stingless bee *Trigona* spp. *Journal of Apicultural Science*, 47(1), 37-48.

Geissman, T. A. (1963). Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds, p.265. En: M. Florkin and E. H. Stotz (Ed.), *Pyrrrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant constituents*, vol. 9. Elsevier, New York, N.Y.

Giannini, T.C., Boff, S., Cordeiro, G.D., Cartolano, E.A., Veiga, A.K., Imperatriz-Fonseca, V.L., Saraiva, A.M. (2015). Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie*, 46(2), 209-223.

González-Acereto, J.A. (2012). La importancia de la meliponicultura en México, con énfasis en la Península de Yucatán. *Bioagrociencias*, 5(1), 34-41.

González, M.S., Peñalosa, C.I. (2000). *Biomoléculas Métodos de análisis*. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Edo. de México, 256.

Grajales-Conesa, J., Vandame, R., Santiesteban-Hernández, A., López-García, A., Guzmán-Díaz, M. (2018). Propiedades fisicoquímicas y antibacterianas de mieles de abejas sin aguijón del Sur de Chiapas, México. *IBCIENCIAS*. 1(1), 1-7.

Guerrini, A., Bruni, R., Maietti, S., Poli, F., Rossi, D., Paganetto, G., Sacchetti, G. (2009). Ecuadorian stingless bee (Meliponinae) honey: A chemical and functional profile of an ancient health product. *Food Chemistry*, 114(4), 1413–1420.

Guzmán, M., Balboa, C., Vandame, R., Albores, M. L., & González-Acereto, J. (2011). Manejo de las abejas nativas sin aguijón en México *Melipona beecheii* y *Scaptotrigona mexicana*. México: MUTUAL, redISA.

- Harborne, J.B. (1998). *Phytochemical Methods A guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman & Hall. (3ra Ed.). London, UK. 295p.
- Heard, T.A. (1999). The role of stingless bees in crop pollination. *Annual review of entomology*, 44(1), 183-206.
- INAFED. (2010). Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México. Estado de Veracruz-Papantla. Consultado en: <http://siglo.inafed.gob.mx/enciclopedia/EMM30veracruz/municipios/30164a.html> el 15 de abril de 2020.
- Iyobe, S. (1997). Appearance of extended-spectrum beta-lactamases. *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine*, 55(5), 1219-1224.
- Jagota, S.K., Dani, H.M. (1982). A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using Follin phenol reagent. *Analytical Biochemistry*, 127(1), 325-327.
- Jimenez, M., Beristain, C.I., Azuara, E., Mendoza, M.R., Pascual, L.A. (2016). Physicochemical and antioxidant properties of honey from *Scaptotrigona mexicana* bee. *Journal of Apicultural Research*. 55(2), 151-160.
- Kalita, P., Barman, T., Pal, T., Kalita, R. (2013). Estimation of total flavonoids content (TFC) and antioxidant activities of methanolic whole plant extract of *Biophytum sensitivum* Linn. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 3(4): 33-37.
- Kent, R.B. (1984). Mesoamerican stingless beekeeping. *Journal of Cultural Geography*, 4(2), 14-28.
- Khalil, M., Moniruzzaman, M., Boukraâ, L., Benhanifia, M., Islam, M., Sulaiman, S. A., & Gan, S. H. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of Algerian honey. *Molecules*, 17(9), 11199-11215.
- Kurşat, M., Emre, I., Yılmaz, Ö., Erecevit, P. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity in the seeds of *Origanum vulgare* L. subsp. *gracile* (C. Koch) Ietswaart and *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) Ietswaart from Turkey. *grasas y aceites*, 62(4), 410-417.
- Kwakman, P.H., te Velde, A.A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Zaat, S.A. (2010). How honey kills bacteria. *The FASEB Journal*, 24(7), 2576-2582.

- Kwapong, P.K., Ilechie, A.A., Kusi, R. (2013). Comparative antibacterial activity of stingless bee honey and standard antibiotics against common eye pathogens. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 3(1), 162-168.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118.-126.
- Lowy, F. D., Hammer, S. M. (1983). *Staphylococcus epidermidis* infections. *Annals of Internal Medicine*, 99(6), 834-839.
- Mason, T. L., Wasserman B. P. (1987). Inactivation of red beet betaglucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry*, 26, 2197–2202.
- Mato, I., Huidobro, J. F., Simal-Lozano, J., Sancho, M. T. (2006). Rapid Determination of Nonaromatic Organic Acids in Honey by Capillary Zone Electrophoresis with Direct Ultraviolet Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1541–1550.
- McClure, J. (1975). En: *The Flavonoids*. Harbone J., Malory T. and Malory H. (Eds). 1° Ed. Editorial Chapman and Hall, Inglaterra.
- Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O.G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline content in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91(3), 571-577.
- Michener, C.D. (2007). *The bees of the world*. (2a Ed.). Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press.
- Michener, C. D. (2013). *The Meliponini*. En P. Vit, S. Pedro y D. Roubik (Ed.), *Pot-honey: a legacy of stingless bees* (pp. 3–17). New York: Springer.
- Molan, P. (2001). Why honey is effective as a medicine: 2. The scientific explanation of its effects. *Bee world*, 82(1), 22-40.
- Molan, P. C., Smith, I. M., & Reid, G. M. (1988). A comparison of the antibacterial activities of some New Zealand honeys. *Journal of Apicultural Research*, 27(4), 252-256.
- Moniruzzaman, M., Yung A.C., Rao, P.V., Hawlader, M.N., Azlan, S.A., Sulaiman, S.A., Gan, S.H. (2014). Identification of phenolic acids and flavonoids in monofloral honey

from Bangladesh by high performance liquid chromatography: Determination of antioxidant capacity. *BioMed Research International*,1-11.

Monter, F.L. (2018). Propiedades nutraceuticas de una miel de *Melipona* de Mérida, Yucatán. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Molyneux, P. 2004. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science ad Technology*, 26(2): 211-219.

Moo-Huchin, V. M., Sauri-Duch, E., Moo-Huchin, M., López-Ponce, M. E. (2015). Calidad De La Miel De Abejas Sin Aguijón. Una Revisión. En: *Congreso Internacional "CUCCAL" "Sobre Inocuidad, Calidad y Funcionalidad de Alimentos en la Industria y Servicios de Alimentación"* (pp. 100-109). México: Boletín Informativo Trabajos Libres de Investigación.

Morales, Y. E., Herrera, M. C., Muñoz, J. (2007). Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38(1), 58-69.

Nataro, J. P., Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142-201.

Nates-Parra, G. (2005). Abejas silvestres y polinización. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. (75),7-20.

Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 153(2), 375-380.

Nordin, A., Sainik, N.Q.A.V., Chowdhury, S.R., Saim, A.B., Idrus, R.B.H. (2018). Physicochemical properties of stingless bee honey from around the globe: A comprehensive review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 73, 91-102.

Norma Oficial Mexicana NOM-004-SAG/GAN-2018, Producción de miel y especificaciones. Diario Oficial de la Federación. 29 abril 2020. 21p. Disponible en: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5592435&fecha=29/04/2020&print=true.

- Nweze, J. A., Okafor, J. I., Nweze, E. I., Nweze, J. E. (2017). Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of two stingless bee honeys: a comparison with *Apis mellifera* honey from Nsukka, Nigeria. *BMC research notes*, 10(1), 566.
- Okusa, P.N., Penge, O., Devleeschouwer, M., Duez, P. (2007). Direct and indirect antimicrobials effects and antioxidant activity of *Cordia gillietii* de Wild (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 112(3), 476-481.
- Oropeza, G.M. (2012). Alcaloides totales y actividad antioxidante de extractos metanólicos de hojas de *Ipomoea murucoides* (casahuate). Universidad Tecnológica de la Mixteca. México. 1-78.
- Özçelik, B., Kartal, M., Orhan, I. (2011). Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical biology*, 49(4), 396-402.
- Padilla-Vargas, P. J., Vásquez-Dávila, M. A., García-Guerra, T.G., Albores-González, M. L. (2014). Pisilnekmej: una mirada a la cosmovisión, conocimientos y prácticas nahuas sobre *Scaptotrigona mexicana* en Cuetzalan, Puebla, México. *Etnoecológica*, 10(1), pp. 37-40.
- Pantoja, A. (2014). *Principios y avances sobre polinización como servicio ambiental para la agricultura sostenible en países de Latinoamérica y el Caribe*. Chile: FAO.
- Papadopoulou, C., Soulti, K., Roussis, I. G. (2005). Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technology and Biotechnology*, 43(1), 41-46.
- Patlán-Martínez, E., Kañetas-Ortega, J. T. (2018). Las abejas nativas retos de su crianza y conservación en Veracruz, México. *Cadernos de Agroecología*, 13(1).
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*, 2014, 1-19.
- Rahua, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H. Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing

flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56,3–12.

Ramamoorthy, P.K., Bono, A. (2007). Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology*, 2(1), 70-80.

Reyes-Salas, E.O., Gazcón-Orta, J.A., Manzanilla-Cano, J.A., Reyes-Salas, A.M., Camou, A., Reyes-González, A., Caballero-Puente, H.D. (2014). Electrochemical evaluation of quality characteristics in honey from *Meliponini* and *Apis Mellifera* bees. *Annals Food Sci. Tech*, 15, 35-40.

Rodríguez-Malaver, A.J., Rasmussen, C., Gutiérrez, M.G., Gil, F., Nieves, B., Vit, P. (2009). Properties of honey from ten species of Peruvian stingless bees. *Natural Product Communications*, 4(9), 1221-1226.

Roubik D.W. (1983). Nest and colony characteristics of stingless bees from Panama (Hymenoptera: Apidae). *J. Kansas Entomol. Soc*, 56: 327-355.

Ruiz-Argüeso, T., Rodríguez-Navarro, A. (1973). Gluconic acid-producing bacteria from honey bees and ripening honey. *Journal of General Microbiology*, 76(1), 211-216.

Sak-Bosnar, M., Sakač, N. (2012). Direct potentiometric determination of diastase activity in honey. *Food Chemistry*, 135(2), 827–831.

Sakagami, S.F. (1982). *Stingless Bees*. En Hermann, H. Social Insects Vol. III, (pp. 361-423).

Salas J.P., Echavarri J.F., Negueruela A. (1993) Influencia de la temperatura en la medida del color de la miel. *Óptica Pura y Aplicada*, 26(2), 549-557.

Saxena, S., Gautam, S., Sharma, A. (2010). Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chemistry*, 118(2), 391–397.

Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30, 3875–3883.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Reventós, R., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*. 299, 152-178.

Singh, G., Raksha, A.U. (2013). *Candida* infection: epidemiology, pathogenesis and recent advances for diagnosis. *Bulletin of Pharmaceutical and Medical Sciences (BOPAMS)*, 1(1), 1-8.

Slaa, E.J., Tack, A.J., Sommeijer, M. J. (2003). The effect of intrinsic and extrinsic factors on flower constancy in stingless bees. *Apidologie*, 34(5), 457-468.

Soria, A.C., González, M.M., de Lorenzo, C. (2002). Los componentes volátiles y el aroma. *La miel de Madrid*, 5, 121-136.

Souza, B. A., Roubik, D. W., Barth, O. M., Heard, T. A., Enríquez, E., Carvalho, C., Villas-Bôas, J., Marchini, L., Locatelli, J., Persano-Oddo, L., Almeida-Muradian, L., Bogdanov, S., Vit, P. (2006). Composition of stingless bee honey: setting quality standards. *Interciencia*, 31(12), 867-875.

Suescún, L., Vit, P. (2008). Control de calidad de la miel de abejas producida como propuesta para un proyecto de servicio comunitario obligatorio. *Fuerza Farmacéutica*, 12, 6-15.

Tong, S.Y., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., Fowler, V.G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*, 28(3), 603-661.

Tsui, V. W. K., Wong, R. W. K., Rabie, A. B. M. (2008). The inhibitory effects of naringin on the growth of periodontal pathogens in vitro. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 22(3), 401-406.

Ulloa, J., Mondragón, P., Rodríguez, R., Reséndiz, J. Y., Rosas, P., 2010. La miel de abeja y su importancia. *Revista Fuente*. 2 (4), 1-4.

Urs, N. V., Dunleavy J. M. (1975). Enhancement of the bactericidal activity of a peroxidase system by phenolic compounds (*Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis*, soybeans). *Phytopathology*, 65, 686-690.

Vanden-Berghe, D.A., Vlietinck, A.J. (1991). Screening methods for antibacterial agents from higher plants. En: Hostettmann, K. (Ed). *Methods in plant biochemistry*. Vol 6: *Assay for Bioactivity*, 47-69.

- Vattem, D. A., Lin, Y. T., Ghaedian, R., Shetty, K. (2005). Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections. *Process Biochemistry*, 40(5), 1583-1592.
- Vidal, M.M.D. (1997). Estudio de flavonoides en líneas de selección de *Dianthus caryophyllus* L. Tesis de doctorado. Universidad de Barcelona. España. 205p.
- Vit, P., Bogdanov, S., Kilchenmann, V. (1994). Composition of Venezuelan honeys from stingless bees (Apidae: Meliponinae) and *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 25(3), 278–288.
- Vit, P., Medina, M., Enríquez, M. (2004). Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *Bee world*, 85(1), 2-5.
- Vit, P., Pulcini, P. (1996). Diastase and invertase activities in Meliponini and Trigonini honeys from Venezuela. *Journal of Apicultural Research*, 35(2), 57–62.
- Yetkin, G., Otlu, B., Cicek, A., Kuzucu, C., Durmaz, R. (2006). Clinical, microbiologic, and epidemiologic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a University Hospital, Malatya, Turkey. *American journal of infection control*, 34(4), 188-192.
- Zandalema, E., 2008. Caracterización Físico-química y evaluación sanitaria de la miel de Mozambique. Tesis de Licenciatura, Facultad de Veterinaria. Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España, 97-134.
- Zepeda, R., Arnold, N., (2018). El cultivo de las abejas sin aguijón: la meliponicultura. En: Arnold, N., Zepeda, R., Vásquez, M., Aldasoro, *Las abejas sin aguijón y su cultivo en Oaxaca, México con catálogo de especies* (pp. 33-47). México: ECOSUR, CONABIO.
- Zepeda, R. (2018). Los productos de la colmena: miel, cerumen, polen y propóleo. En: Arnold, N., Zepeda, R., Vásquez, M., Aldasoro, *Las abejas sin aguijón y su cultivo en Oaxaca, México con catálogo de especies* (pp. 50-58). México: ECOSUR, CONABIO.
- Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C., Zhou, Z. (2016). Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food chemistry*, 196, 885-896.