



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**“Estudio de la actividad antimicrobiana de dos
muestras de miel de diferentes localidades de
México”**

TESIS

Que para obtener el título de

B I Ó L O G A

Presenta:

García Gómez Fátima Sofía

Directora de tesis:

Dra. Ana Bertha Hernández Hernández

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado De México.

CD. MX. 2024.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi casa de estudios desde el bachillerato hasta la licenciatura, que a través de ella conocí personas maravillosas que hoy forman parte de mi vida, y también por brindarme las herramientas necesarias para completar esta etapa.

A la Dra. Ana Hernández, mi directora de tesis, por la paciencia, orientación y el apoyo que me brindó durante este proceso. Gracias por siempre esclarecer mis dudas, por enseñarme cosas nuevas y por su cariño.

A la Dra. Margarita Canales por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, otorgarme las herramientas necesarias para realizar este proyecto y por siempre recibir su apoyo.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez por apoyarme con todas mis dudas, orientarme en todo lo necesario y por retroalimentar mi trabajo con amabilidad.

A los compañeros de los laboratorios de Farmacognosia e Inmunología, especialmente a Uriel, Jimena, Toño, Pili, Wendoline y Marlene por integrarme al equipo, brindarme su apoyo, orientación y consejos cuando me fue necesario.

A mis compañeros tesistas Kenneth y Bauma por su apoyo y consejos; y especialmente a Jessica y Mikel por siempre brindarme todo su apoyo, por darme consejos cuando me fue necesario, por las risas compartidas y por hacer más ameno todo este proceso.

A Karla por ser mi primera amiga de la carrera y continuar conmigo, que a pesar de todo siempre está apoyándome, dándome consejos, y compartiendo momentos y risas. Gracias por tu amistad tan sincera.

A Mikel por convertirse en un gran amigo, por apoyarme y esclarecer dudas cuando me fue necesario en este proceso tan importante, y especialmente por los momentos y risas compartidas.

Dedicatorias

A Ada Luz Gómez Castillejos, mi madre, por esas noches que me hacías compañía hasta que finalizara mis tareas, por tus consejos y preocupaciones, por siempre apoyarme y creer en mí, por darme la mano y levantarme cada vez que quería darme por vencida o me sentía mal, por todos los sacrificios que has hecho por mí, por ser no solo mi madre, sino también mi mejor amiga, mi confidente, la persona a la que le puedo contar cosas y sé que nunca seré juzgada. Este logro va dedicado especialmente a ti, muchas gracias por todo, mamá. Te amo con todo mi corazón.

A José Miguel García Tovar, mi padre, por apoyarme en todo el transcurso de la carrera, por tus consejos, por acompañarme a lugares a “bichear” y compartir la emoción y curiosidad por los seres vivos, por creer y siempre estar para mí. Gracias a tu cariño, confianza y apoyo he alcanzado una meta más. Gracias por todo, papá, te amo.

A Abraham Isaac García Gómez, mi hermano, gracias por todo el apoyo y cariño que me has brindado, por también creer en mi cuando me aventuré a estudiar esta carrera, por tus consejos y por acompañarme en todo este proceso. Gracias por todo, hermano, fuiste una pieza clave en este proceso y siempre te estaré agradecida. Te amo.

A Jocelyn Ortega, mi mejor amiga, gracias por apoyarme siempre, por tu cariño, tus consejos y los buenos momentos que hemos compartido, también gracias por creer en mí y echarme porras cada vez que sentía que ya no podía. Gracias por demostrarme lo que es una amistad sincera y bonita, donde siempre existe el apoyo y complicidad. Te quiero muchísimo, amiga.

A la familia Gómez de Chiapas, por sus buenos deseos que siempre me mostraron al contarles que estudiaría esta carrera, y que, al contrario de cuestionarme, me animaron a seguir adelante.

A mi gatita Molly por hacerme compañía en las madrugadas que me quedaba haciendo trabajos y que con solo existir me impulsa a seguir adelante.

A mi tío Ricardo, mi tía Claudia y a mi bisabuela Mariana Albores que siempre creyeron en mí, me apoyaron y me demostraron todo su amor, gracias infinitas hasta el cielo.

Índice general

Índice de figuras	i
Índice de cuadros	ii
Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	3
Justificación.....	4
Problema	4
Hipótesis	5
Objetivo general	5
Objetivos particulares para cada muestra de miel.....	5
Materiales y métodos.....	5
Resultados	11
Discusión.....	23
Conclusiones.....	32
Apéndice I. Parámetros de calidad de la miel, estudio organoléptico.	34
Apéndice II. Cuantificación de Ácidos Orgánicos.....	35
Apéndice III. Cuantificación de carbohidratos reductores por la técnica de Nelson-Somogyi	36
Apéndice IV. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	38

Apéndice V. Cuantificación de vitamina C (ácido ascórbico) con reactivo de Folin-Ciocalteu.....	40
Apéndice VIII. Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el método de reducción del radical DPPH	44
Apéndice IX. Método de difusión en agar Kirby-Baüer.....	46
Referencias bibliográficas.....	47

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de la ubicación del municipio de Altotonga en el estado de Veracruz.....	6
Figura 2. Mapa de la ubicación del municipio de Chiapa de Corzo en el estado de Chiapas.....	7
Figura 3. Curva patrón de glucosa [200µg/mL], leída a 565 nm.....	13
Figura 4. Curva patrón de albumina [100µg/mL], leída a 595 nm.....	14
Figura 5. Curva patrón de ácido ascórbico [100 µg/mL], a 760 nm.....	15
Figura 6. Curva patrón de ácido gálico [0.2 mg/mL], leída a 760 nm.....	16
Figura 7. Curva patrón de quercetina [0-100µg/mL], a 450 nm.....	17
Figura 8. Capacidad antioxidante de la miel de Veracruz (miel 1).....	18
Figura 9. Capacidad antioxidante de la miel de Chiapas (miel 2).....	18
Figura 10. Halos de inhibición de los tratamientos de miel sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas de interés clínico.....	19
Figura 11. Halos de inhibición de los tratamientos de miel sobre las cepas de bacterias.....	22

Índice de cuadros

Cuadro 1. Caracterización organoléptica de las muestras de miel.....	11
Cuadro 2. Características físicas y químicas de las muestras de miel.....	12
Cuadro 3. Efectos de las muestras de miel sobre el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	20
Cuadro 4. Especificaciones fisicoquímicas de la miel.....	34
Cuadro 5. Curva patrón para la cuantificación de carbohidratos por el método de Nelson-Somogyi.....	36
Cuadro 6. Curva patrón para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	38
Cuadro 7. Curva patrón para la cuantificación de ácido ascórbico con reactivo de Folin-Ciocalteu.....	40
Cuadro 8. Concentraciones para preparar curva patrón para la determinación de fenoles totales.....	41
Cuadro 9. Curva patrón para la cuantificación de flavonoides totales.....	42
Cuadro 10. Concentraciones estándar para determinar la actividad antioxidante de una muestra de miel mediante la reducción del radical DPPH.....	44

Resumen

El aprovechamiento de los recursos naturales ha ayudado en gran medida al desarrollo de la humanidad, pues a partir de ellos se han obtenido recursos para las cuestiones alimenticias, medicinales y de refugio. La miel es una sustancia dulce natural producida por abejas a partir del néctar de las plantas y debido a su composición química, puede considerarse un alimento funcional, ya que desde tiempos antiguos se ha utilizado no sólo como nutriente sino también como medicina.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas de dos muestras de miel; una proveniente de Altotonga, Veracruz y la otra de Chiapa de Corzo, Chiapas. Además, se analizaron las propiedades organolépticas (aroma, sabor, consistencia y color); fisicoquímicas (densidad, contenido de humedad, concentración de fructosa, ángulo de rotación, °Brix y pH); propiedades bioquímicas (ácidos orgánicos, carbohidratos reductores, proteínas, ácido ascórbico y metabolitos secundarios); y las propiedades biomédicas que incluyen la actividad antimicrobiana y la capacidad antioxidante.

Como resultados, se observó que, de los elementos cuantificados en el análisis bromatológico, la miel de Veracruz presentó concentraciones más altas de los compuestos analizados, sin embargo, a pesar de presentar mayor contenido de fenoles y flavonoides que la miel de Chiapas, ésta última tuvo ligeramente una mayor capacidad antioxidante.

En cuanto a la actividad antimicrobiana, ambas mieles presentaron actividad, aunque la miel de Chiapas presentó una actividad más significativa, pues inhibió el crecimiento de las cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas, mientras que la miel de Veracruz no presentó efecto sobre *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

En conclusión, dadas las características organolépticas y químicas, así como su capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana de cada una de las muestras de miel, se pueden considerar como un buen tratamiento alternativo a los fármacos, además se pueden considerar como alimentos funcionales.

Introducción

El aprovechamiento de los recursos naturales ha ayudado en gran medida al desarrollo de la humanidad (Ulloa et al., 2010), pues a partir de ellos se han obtenido recursos para las cuestiones alimenticias, medicinales y de refugio. Una alimentación saludable consiste en combinar varios alimentos de forma equilibrada para así satisfacer las necesidades nutritivas que requiere el ser humano (Izquierdo et al., 2004), ya que, con una correcta nutrición, la salud tanto física como mental se verá beneficiada dando lugar a una buena productividad en las actividades diarias (Birujete et al., 2009).

Actualmente, han sido objeto de atención y de estudio los llamados “alimentos funcionales”, los cuales, además de proporcionar los beneficios nutricionales típicos, son alimentos que poseen capacidad para tener un impacto positivo en una o varias funciones particulares del cuerpo, que van más allá de los fines alimenticios, pues promueven la salud y el bienestar, ya sea disminuyendo o previniendo la probabilidad de enfermedades, o incluso ambas cosas a la vez (Aguirre, 2019).

La miel es una sustancia dulce natural producida por abejas a partir del néctar de las plantas o de otras secreciones extra florales que las abejas liban, transportan, transforman, combinan con sustancias propias, deshidratan, concentran y almacenan en panales para que maduren (NOM-004-SAG/GAN-2018). Las abejas transforman el néctar a miel mediante cambios físicos y químicos, iniciando por un proceso de evaporación, en el cual, el néctar pierde hasta una tercera parte de su contenido de humedad durante su almacenamiento en la colmena. Otro proceso al que la miel es sometida es el de la acción de enzimas que las obreras adicionan al néctar, como es la invertasa (también conocida como sacarasa), la cual hidroliza la sacarosa presente en el néctar, dando como resultado glucosa y fructosa (Alatriste-Pérez et al., 2017).

Los componentes principales de la miel son los azúcares (82.4%), también contiene agua, oscilando su porcentaje entre el 16 y el 18%, aproximadamente. Dicho parámetro influye en la estabilidad de la miel frente a la fermentación, así como en otras propiedades como la viscosidad, densidad y características organolépticas (Mato, 2004). Además, contiene pequeñas cantidades de otros compuestos (1% aproximadamente), como los ácidos

orgánicos, sustancias minerales, aminoácidos, proteínas, enzimas, vitaminas, lípidos, sustancias volátiles aromáticas, entre otros (Alatriste-Pérez et al., 2017). Dichos compuestos van a determinar gran parte de las características de la miel como el color, el aroma y el sabor.

Debido a su composición química, la miel puede considerarse un alimento funcional, ya que desde tiempos antiguos se ha utilizado no sólo como nutriente sino también como medicina, pues se tiene registro sobre su uso para el tratamiento de heridas, inflamaciones cutáneas, eczemas, tos, mal aliento, gruñido intestinal por diarrea, quemaduras de la piel, dolor de garganta, entre otros (Valadez et al., 2004). Además, diferentes autores han reconocido que la miel posee características antibacterianas y antioxidantes que se deben en parte a su osmolaridad, su bajo pH, la presencia de peróxido de hidrógeno y algunos componentes fitoquímicos específicos de las diferentes clases de plantas, las cuales le transfieren sus cualidades al néctar recolectado por la abeja (Becerra et al., 2016).

La composición de los componentes activos que se encuentran en las plantas depende de varios factores, como el biotipo y el quimiotipo de la planta y las condiciones climáticas en la que ésta se desarrolla. Por ello, se puede esperar que las mieles de diferentes regiones tengan propiedades diferentes (Álvarez-Suárez et al., 2010).

Antecedentes

Estrada et al., (2005), evaluaron la actividad antimicrobiana de 25 muestras de miel comercializadas en Costa Rica en diferentes cepas bacterianas y una cepa de *Aspergillus niger*, encontrando que el 92% de las muestras mostraron algún tipo de inhibición sobre las bacterias evaluadas y un 24% logró inhibir el crecimiento de *S. aureus* hasta en una concentración de 25% v/v, sin embargo, la cepa de *Aspergillus niger* no fue inhibida por ninguna de las mieles evaluadas, esto último se lo atribuyen a que ni la osmolaridad ni el pH son suficientes como agentes antimicrobianos cuando la miel es diluida.

Rodríguez et al., (2007), evaluaron la capacidad antioxidante de mieles venezolanas, las cuales fueron tres muestras de miel de *Apis mellifera* y dos muestras de *Melipona favosa* y *Tetragonisca angustula*, y se compararon con la capacidad antioxidante de soluciones de ácido lipoico, melatonina y quercetina, encontrando así que todas las mieles fueron mejores

antioxidantes que el ácido lipoico y la miel artificial, aunque indican que la melatonina y la quercetina son mejores antioxidantes que la miel en las reacciones tipo Fenton.

Viuda-Martos et al., (2010), elaboraron un perfil aromático y evaluaron las propiedades fisicoquímicas de diez muestras de miel, colectadas en dos estaciones y ecosistemas agrícolas diferentes de Tabasco, encontrando que la humedad oscila entre 18.90 y 24.30% de la composición total; el color de las muestras las ubica dentro de la categoría de las mieles oscuras; los valores de pH oscilaron entre 3.25 al 3.97; la fructuosa (39.45%) es el azúcar principal, seguida de la glucosa (35.74%); el perfil aromático mostró que hay altos contenidos de compuestos relacionados con los bencenos y los furanos.

Macias-Nieves et al., (2020), evaluaron la capacidad antioxidante y el contenido fenólico total de cuatro variedades de miel producidas en Zacatecas, obteniendo que las muestras de flor de gatuño cremosa (*Mimosa* spp.) (144.9 mg de GAE 100 g⁻¹) y flor de gatuño (*Mimosa* spp.) (141.4 mg de GAE 100 g⁻¹) mostraron un alto contenido de fenoles totales y mayor capacidad antioxidante que las otras dos muestras (miel multifloral y de mezquite (*Prosopis laevigata*)).

Justificación

Debido a su composición química y a las propiedades biomédicas reportadas dentro de la medicina tradicional, la miel, además de ser un alimento nutritivo, también es una alternativa para el tratamiento de diversos padecimientos, como las infecciones microbianas, las cuales a lo largo del tiempo han ido generando mayor resistencia a los fármacos, por tal motivo, existe la necesidad de buscar nuevas alternativas a tratamientos eficaces, cuidando el bienestar humano, siendo la miel una opción ideal para contrarrestar estas infecciones patógenas.

Problema

Con base a lo antes mencionado, ¿la miel de Altotonga, Veracruz y la miel de Chiapa de Corzo, Chiapas presentarán actividad antimicrobiana?

Hipótesis

De acuerdo con la literatura, las propiedades fisicoquímicas de la miel y sus propiedades medicinales que la hacen un alimento funcional varían dependiendo el origen botánico y geográfico. Por lo que se espera que ambas mieles tengan propiedades únicas y actividad antimicrobiana.

Objetivo general

Determinar las características organolépticas, químicas, físicas y actividad antimicrobiana de dos muestras de miel, una proveniente de Altotonga, Veracruz y otra de Chiapa de Corzo, Chiapas.

Objetivos particulares para cada muestra de miel.

- 1.- Determinar las propiedades físicas y organolépticas de cada miel (densidad, porcentaje de humedad, grados Brix, ángulo de rotación, color, sabor, olor y consistencia).
- 2.- Cuantificar los ácidos orgánicos, carbohidratos reductores, proteínas, ácido ascórbico, fructosa, alcaloides y pH.
- 3.- Cuantificar fenoles y flavonoides.
- 4.- Evaluar la capacidad antioxidante.
- 5.- Evaluar la actividad antimicrobiana en cepas de:
 - Bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *Enterococcus faecalis*.
 - Bacterias Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

Materiales y métodos

Obtención de las muestras de miel

La miel proveniente de Altotonga, Veracruz, fue proporcionada por el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. El municipio de Altotonga, Veracruz se encuentra ubicado en las coordenadas 19°46' latitud norte y 97°15' longitud oeste, a una altura de 1880 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con Atzalan y Misantla, al este con Misantla, al sur con

Tenochtitlán, Tatatila, Las Minas, Villa Aldama y Perote, al oeste con Jalacingo. Cuenta con una superficie de 328.66 Km² (Figura 1).

Con el fin de simplificar la nomenclatura de las muestras, se designará esta miel como Miel 1.

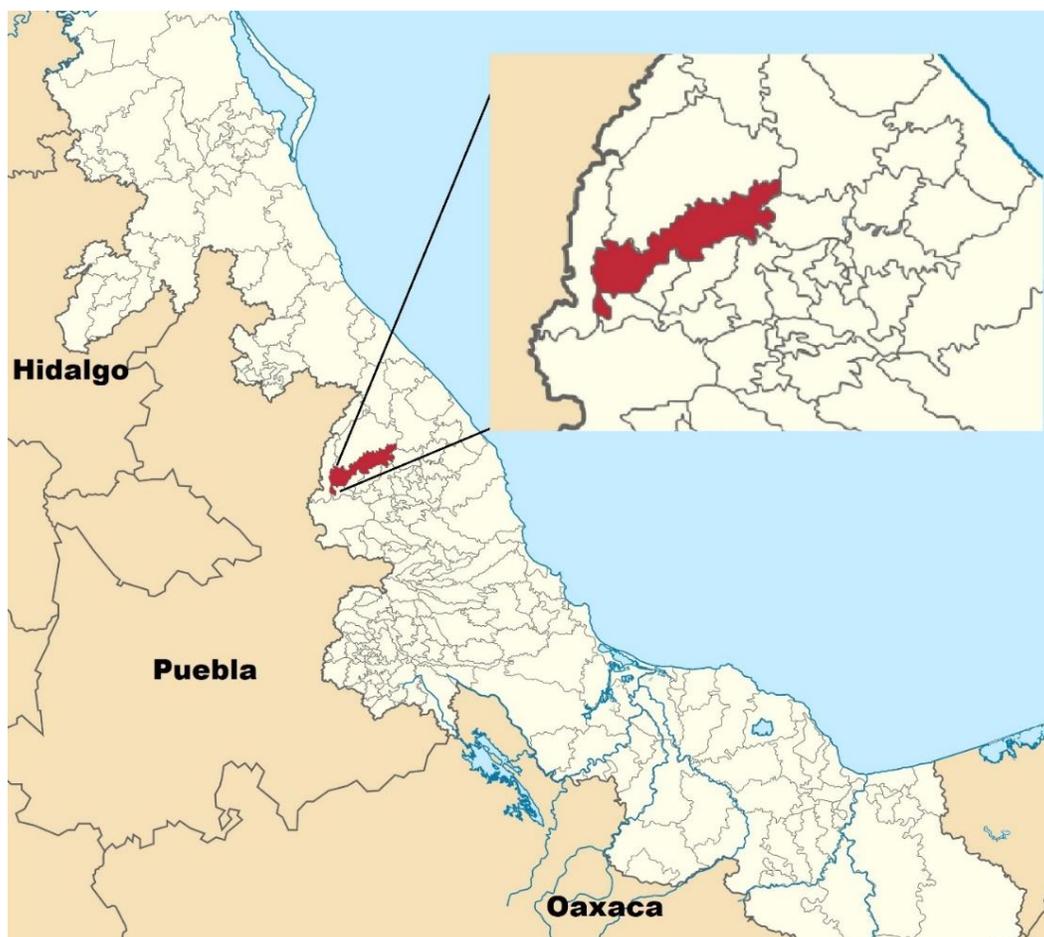


Figura 1. Mapa de la ubicación del municipio de Altotonga en el estado de Veracruz (Tomada y modificada de https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Mexico_Veracruz_Altotonga_location_map.svg).

La segunda muestra de miel fue obtenida gracias a una donación de un apiario del municipio de Chiapa de Corzo, Chiapas. El municipio de Chiapa de Corzo se ubica en los límites de la depresión Central y del Altiplano Central, a 20 min. de Tuxtla Gutiérrez; y a 50 min. de San Cristóbal de las Casas. Limita al norte, con Soyaló y Usumacinta, al oeste, con Tuxtla Gutiérrez, Suchiapa y Villaflores; al este, con Zinacantán, Ixtapa y Acala, y al sur con Villa Corzo (Figura 2).

Con el fin de simplificar la nomenclatura de las muestras, se designará esta miel como Miel 2.

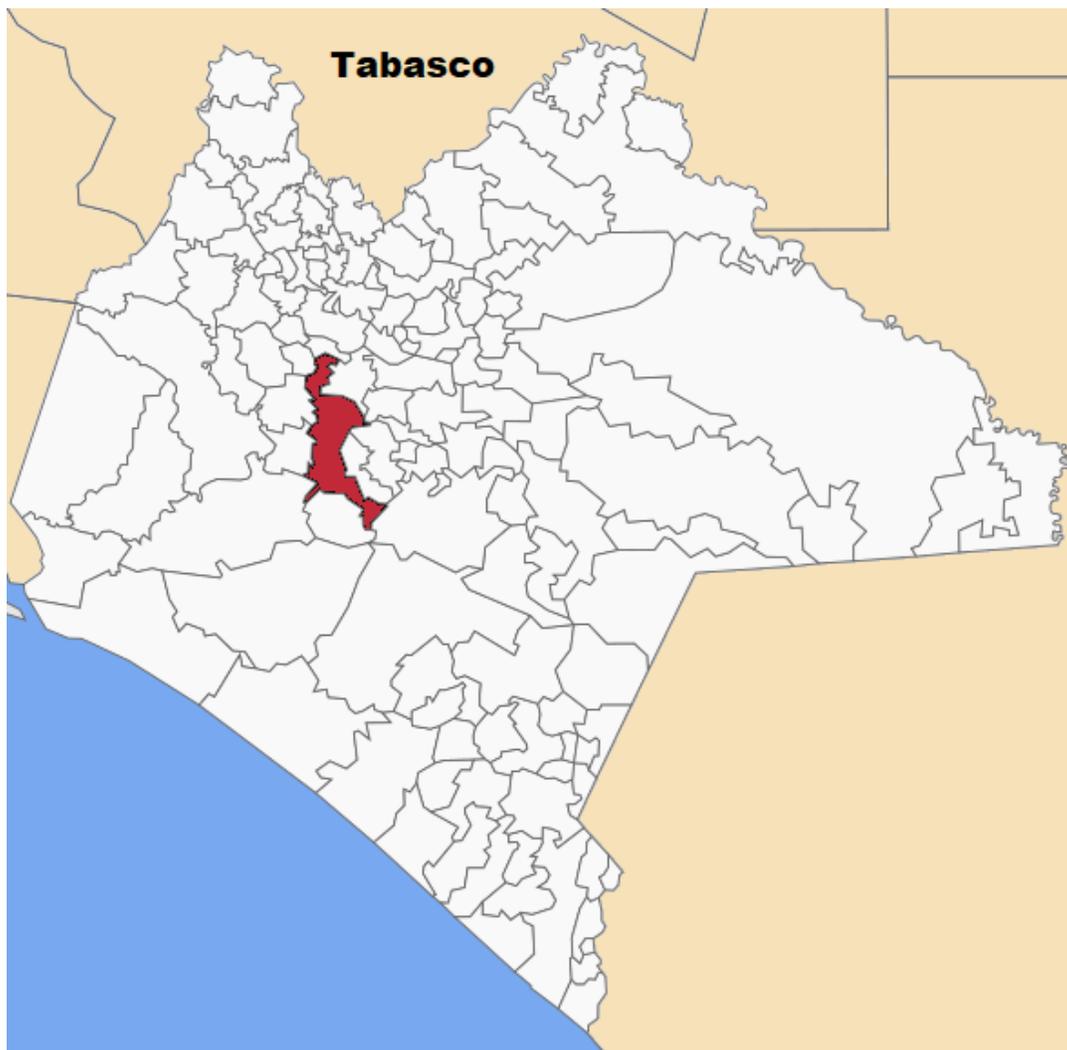


Figura 2. Mapa de la ubicación del municipio de Chiapa de Corzo en el estado de Chiapas (Tomada y modificada de https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Chiapa_de_Corzo_en_Chiapas.svg).

Estudio bromatológico

Se evaluaron los parámetros de calidad: propiedades fisicoquímicas y organolépticas de las muestras de miel (densidad, humedad, pH, concentración de fructosa, ángulo de rotación, °Brix, color, sabor, aroma, consistencia), de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana de la miel NOM-004-SAG/GAN-2018 (Apéndice I).

La densidad absoluta se evaluó por la técnica convencional usando la fórmula:

$$\rho = \frac{m}{v}$$

Donde:

ρ = densidad

m= masa

v= volumen.

Para la medición del pH se diluyeron 10 g de miel en 75 mL de agua destilada, posteriormente se midió con la ayuda de un potenciómetro. Por otro lado, la humedad, los sólidos totales disueltos, el ángulo de rotación y la concentración de fructosa se midieron con un refractómetro Repo-4.

Para el análisis de color se utilizó un fotómetro HANNA HI96785.

Cuantificación de ácidos orgánicos (González y Peñalosa, 2000).

Se realizó a través de una titulación con NaOH al 0.01N. Para ello, se disolvieron 10 g de miel en 75 mL de agua destilada con 5 gotas de fenolftaleína. Finalmente se realizó la titulación cargando una bureta con 20 mL de la solución titulante hasta que la solución problema presentara un cambio de color (Apéndice II).

Cuantificación de carbohidratos reductores por la técnica de Nelson-Somogyi. (González y Peñalosa, 2000)

Los azúcares reductores se cuantificaron por medio de la técnica de Nelson-Somogyi, realizando una extracción de 10 mg de la muestra de miel con 2 mL de etanol al 80%, procesando la muestra de acuerdo con la curva patrón de glucosa 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$, la cual se preparó disolviendo 1 mg de glucosa en 5 mL de agua destilada. Finalmente se leyó en el espectrofotómetro a 565 nm. (Apéndice III).

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford (García y Vázquez, 1998).

Para esta determinación, se extrajeron las proteínas presentes en 1 g de miel utilizando 4 mL de solución de metanol-cloroformo-agua (12:5:3), homogenizando en un baño de hielo. Posteriormente se centrifugó a 4500 rpm por 10 minutos, después se le agregó 1 mL de cloroformo y 1.5 mL de agua destilada al sobrenadante, se centrifugó por segunda vez y se utilizó albúmina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la curva patrón. Se leyó por medio de una placa ELISA a 595 nm (Apéndice IV).

Determinación y cuantificación del ácido ascórbico (Jagota y Dani, 1982).

A 1 g de las muestras de miel se les agregaron 4 mL de ácido tricloroacético al 10% y se homogeneizó por 5 minutos, posteriormente se enfrió en un baño de hielo y se procedió a centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos. Se tomaron alícuotas de 20, 30, 40 y 50 μ L de sobrenadante a las que se les agregaron 180, 170, 160 y 150 μ L de agua destilada, respectivamente y se agregó 20 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu a todas las preparaciones. Finalmente se realizó una curva patrón con ácido ascórbico como solución stock (100 μ g/mL) y se leyó la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (Apéndice V).

Determinación cualitativa de metabolitos secundarios

Para la determinación cualitativa de fenoles, flavonoides y alcaloides, se disolvieron 5 gramos de miel en 10 mL de agua, y se utilizaron cinco tubos de ensayo donde se les agregaron 2 mL a cada uno, esto para las cuatro pruebas y uno como testigo.

Para la determinación de fenoles se agregaron de 4 a 5 gotas de FeCl_3 , para flavonoides se agregaron gotas de AlCl_3 y para alcaloides primero se agregaron 2 gotas de HCl para acidular y posteriormente se agregó a un tubo una ligera cantidad de solución Dragendorff y al otro la solución de Mayer, para finalmente observar la reacción.

Cuantificación de alcaloides (Shamsa et al., 2008).

Se realizó mediante una reacción utilizando buffer de fosfato y verde de bromocresol. Se diluyó 1 g de miel en 5 mL de agua destilada, posteriormente se tomaron 1.2 mL de la preparación anterior y después a ese 1.2 mL se le agregaron 5 mL de buffer y 5 mL de verde de Bromocresol, respectivamente. Posteriormente, al tubo se le agregaron 5 mL de cloroformo, gradualmente, es decir, primero se le agregaron 50 μ L de cloroformo y se mezcló en un vórtex, después nuevamente se le colocó 1 mL de cloroformo y se volvió a mezclar, posteriormente con ayuda de una pipeta Pasteur se recuperó el precipitado que se formó y nuevamente se le agregó 1.5 mL de cloroformo, se mezcló y se le añadió los últimos 2 mL de cloroformo, y nuevamente se recuperó el precipitado. Finalmente se realizó la lectura a 470 nm en un espectrofotómetro.

Determinación de la concentración de fenoles totales (Singleton et al., 1999).

Se midió a través de espectrofotometría. Se preparó una curva patrón de ácido gálico con una concentración de 0.2 mg/mL, la muestra problema se preparó con una concentración de 300 mg de miel diluidos en 500 μ L, se agitó con un vórtex y en una probeta se aforó a 1 mL. Posteriormente en tubos de ensaye se colocaron 25 μ L, 50 μ L y 100 μ L de la muestra problema. Con ayuda de una micropipeta se colocaron 200 μ L de cada concentración en pozos de una placa Elisa. Finalmente se dejó incubando 1 hora para después leer la absorbancia a 760 nm (Apéndice VI).

Determinación de flavonoides totales por el método de Dowd (Ramamoorthy y Bono, 2007).

Se realizó construyendo una curva patrón de quercetina (0-100 μ g/mL) y cloruro de aluminio (AlCl_3) al 2%. Para la preparación de las soluciones problemas se disolvieron 600 mg de miel en 3 mL de metanol (MeOH) grado HPLC, posteriormente se tomó una alícuota de 1 ml y se le agregó 1 ml de cloruro de aluminio. Finalmente se pusieron por triplicado cada uno en una placa ELISA, se incubó durante 30 minutos y se midió la absorbancia con el espectrofotómetro a 450 nm (Apéndice VII).

Capacidad antioxidante

Evaluación de la capacidad antioxidante (Okusa et al., 2007).

Se llevó a cabo por medio de la reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) por parte de la muestra problema para calcular la capacidad antioxidante de la miel al 50% (CA_{50}). De las muestras de miel se tomaron 10 mg que se disolvieron en 5 mL de metanol (MeOH) grado HPLC (STOCK 1) y se preparó otra solución (STOCK 2) tomando 20 μ l del STOCK 1 y agregando 180 μ l de metanol. Después en una placa Elisa se colocaron 50 μ l de cada tubo de ensayo y 150 μ l de DPPH con 3 repeticiones de cada concentración, como blanco se llenaron pozos con 200 μ l de metanol. Se dejó incubar 30 minutos y finalmente se evaluó la reducción del DPPH por medio de espectrofotometría (Apéndice VIII).

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Organismos utilizados

Se evaluó la actividad antimicrobiana de las muestras de miel contra las cepas de bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* CDBB-1044, *Staphylococcus aureus* (caso clínico) *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* CDBB-B-1533 y Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* CDBB-B-999, *Escherichia coli* (caso clínico) del laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos.

Evaluación cualitativa

Se empleó el método de difusión en agar Kirby-Baier (CLSI, 2020; Vanden Berghe y Vlietnick, 1991), utilizando caldo y agar Müller-Hinton como medio de cultivo, y utilizando como control positivo sensidiscos impregnados con 25 µg de cloranfenicol. Se realizaron pozos en el agar con la boquilla de pipetas Pasteur y se colocó directamente la miel hasta llenar el pozo. Las cajas se incubaron 24 horas a 35 °C (Apéndice IX).

Resultados

Propiedades físicas y organolépticas de las muestras de miel

Los resultados del análisis sensorial de las características organolépticas de la miel están reportados de acuerdo con los criterios descritos por la Norma Oficial Mexicana de la miel (NOM-004-SAG/GAN-2018) en el cuadro 1.

Las características como olor, sabor y consistencia se determinaron de manera sensorial con base en la norma antes mencionada, por medio de la percepción de la investigadora y 7 personas más a las que se les solicitó olieran y probaran la miel para consensuar el dato.

Cuadro 1. Caracterización organoléptica de las muestras de miel.

	Miel 1	Miel 2
Color (mm Pfund)	Ámbar oscuro (150)	Ámbar (88)
Olor	Característico de la miel	Resina
Sabor	Dulce con notas ácidas	Dulce con un toque cítrico
Consistencia	Fluida	Fluida

Las características físicas y químicas se reportan en el cuadro 2 de acuerdo con las indicaciones del documento anteriormente mencionado.

Cuadro 2. Características físicas y químicas de las muestras de miel

	Miel 1	Miel 2
Densidad (g/mL)	1.2536	1.50742
pH	5.09	3.9
Contenido de humedad (%)	16.9	13.1
Concentración de fructosa	50.8*	57.8
Ángulo de rotación	-0.14	-2.59
Sólidos totales disueltos °Brix (%)	81.4	81.8

*Para obtener la concentración de fructosa se tuvo que diluir la miel con agua destilada (5g / 40mL).

Propiedades bioquímicas

Cuantificación de ácidos orgánicos

La reacción ácido-base entre los ácidos orgánicos de la muestra de miel con la solución titulante de NaOH 0.01N más las gotas de fenolftaleína como indicador, permitió determinar que la cantidad de ácidos orgánicos presentes en un kilogramo de la miel 1 es de 1.3 meq Ác.O/Kg y en la miel 2 es de 0.32 meq Ác.O/Kg.

Cuantificación de carbohidratos reductores por la técnica de Nelson-Somogyi

Los azúcares reductores se cuantificaron gracias a la reacción de estos con el ion de cobre, pues se forma Cu₂O (óxido cuproso), que al reaccionar con arsenomolibdato forma un complejo de color azul cuya concentración se puede medir y determinar el porcentaje equivalente que contiene la muestra de estos azúcares. Al realizar una curva patrón de glucosa

e interpolarla (Figura 3), se calculó para la Miel 1 un 84.31% y para la Miel 2 un 81.64% de azúcares reductores.

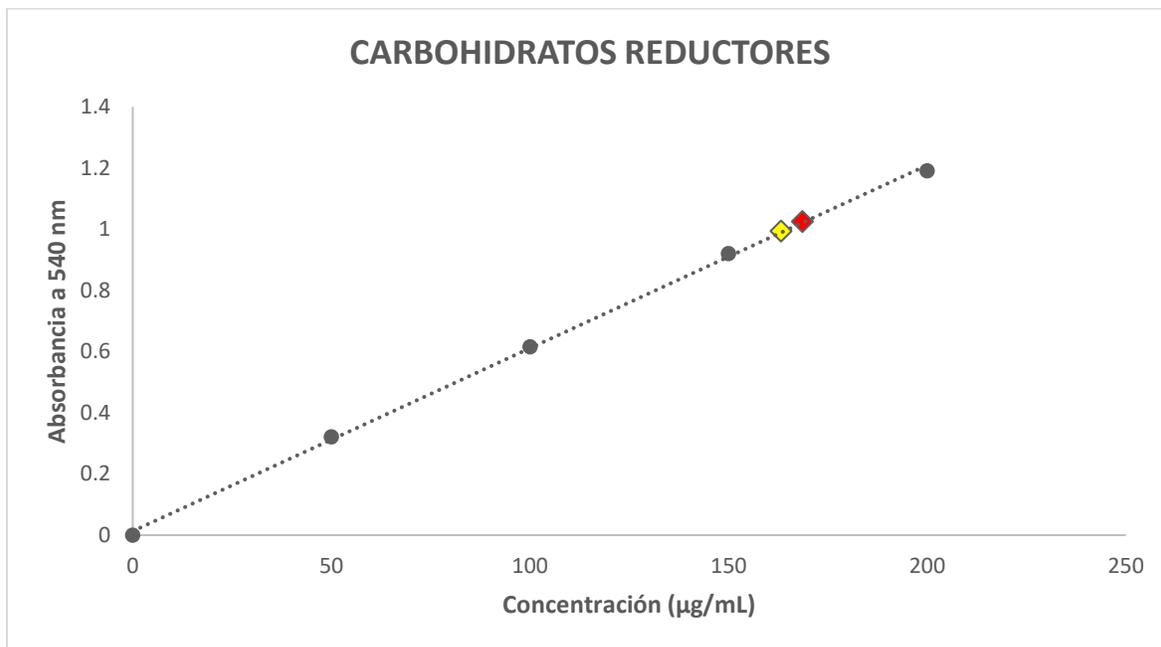


Figura 3. Curva patrón de glucosa[200µg/mL], a 565 nm. En rojo se muestra el valor de la Miel 1 y en amarillo el valor de la Miel 2.

Cuantificación de proteínas

El colorante de color azul que se forma en el método de Bradford al cuantificar las proteínas fue leído mediante espectrofotometría a 595 nm e interpolado en una curva patrón de albúmina (Figura 4), determinando un porcentaje de proteínas de 0.0772% para la miel 1 y 0.0665% para la miel 2.

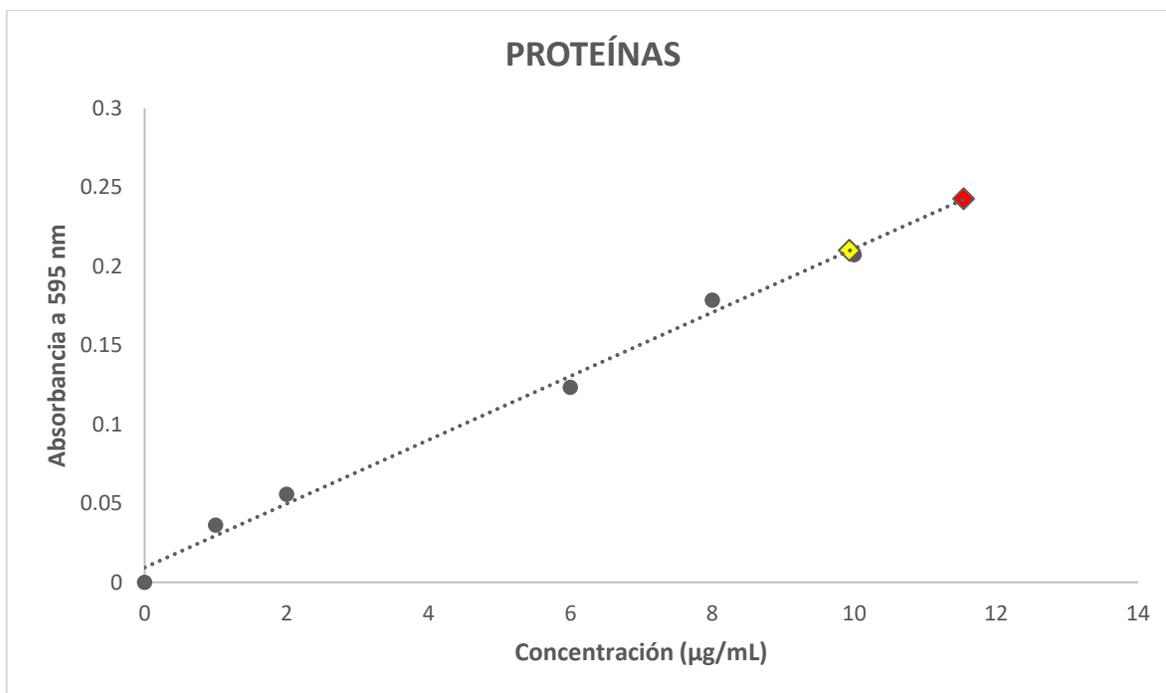


Figura 4. Curva patrón de albumina [100µg/mL], leída a 595 nm. En rojo se muestra el valor de la Miel 1 y en amarillo el valor de la Miel 2.

Determinación y cuantificación del ácido ascórbico

De la extracción y respectiva cuantificación del ácido ascórbico utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, se midió la absorbancia a 760 nm e interpolando en una curva patrón de ácido ascórbico (Figura 5), se pudo determinar un contenido de 307.768595 mg/100 g para la miel 1 y 70.14876038 mg/100g para la miel 2.

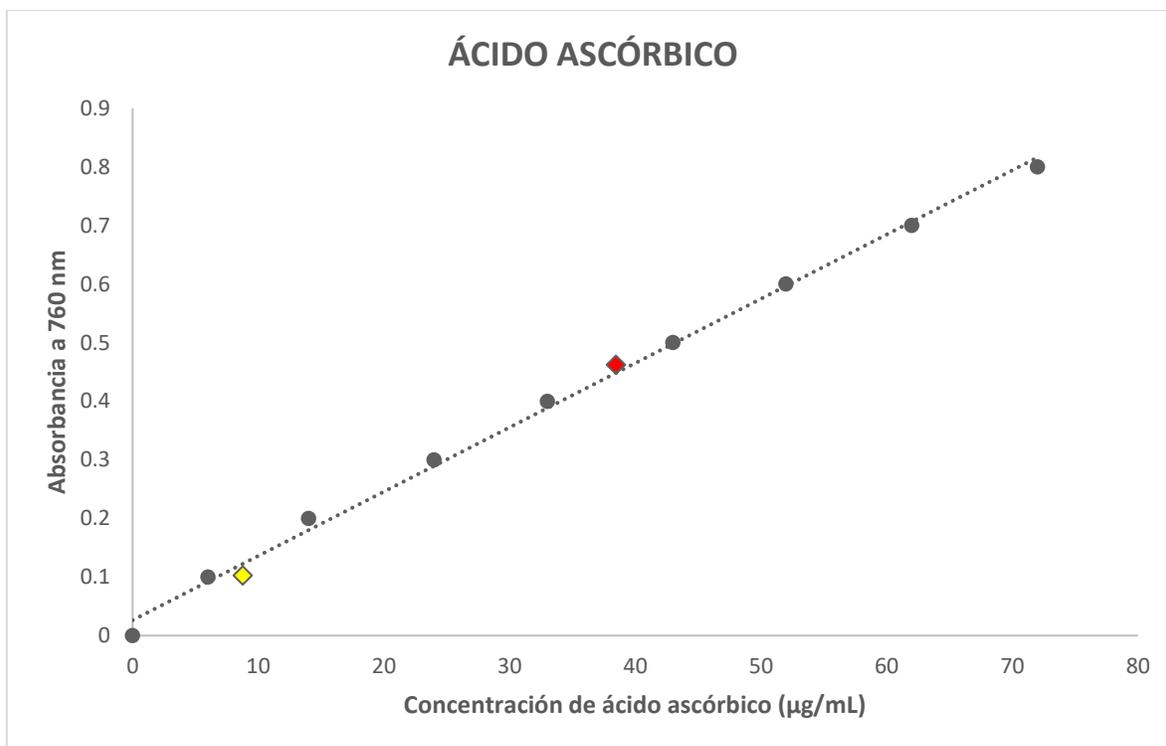


Figura 5. Curva patrón de ácido ascórbico [100 µg/mL], a 760 nm. En rojo se muestra el valor de la Miel 1 y en amarillo el valor de la Miel 2.

Determinación cualitativa de metabolitos secundarios

Después de añadir las gotas de FeCl_3 a la miel para determinar la presencia de fenoles, se observó un ligero cambio de color en la parte superior de la muestra, interpretando como positiva la presencia de dichos compuestos en la muestra. Respecto a la prueba realizada con AlCl_3 para determinar la presencia de flavonoides, no se observó ninguna reacción, por lo que la presencia de estos compuestos se tomó como negativa. En el caso de alcaloides, con la solución de Dragendorff se observó un ligero asentamiento de color negro, tomando como positiva la presencia de estos compuestos, aunque con la solución de Mayer no se observó ninguna reacción. Sin embargo, debido a que esta determinación es cualitativa, se optó por realizar una prueba cuantitativa para cada uno de los compuestos evaluados, con el fin de determinar con certeza en que cantidad se encontraban presentes.

Cuantificación de alcaloides

La cuantificación de alcaloides realizada con el buffer de fosfato y verde de bromocresol fue negativa para ambas mieles.

Determinación de la concentración de fenoles totales

La concentración de fenoles cuantificada por espectrofotometría e interpolada en una curva patrón de ácido gálico (Figura 6) con base a una reacción colorimétrica de óxido reducción utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu como agente oxidante, dio como resultado 160 mg eAG/100 g para la miel 1 y 60 mg eAG/100 g para la miel 2.

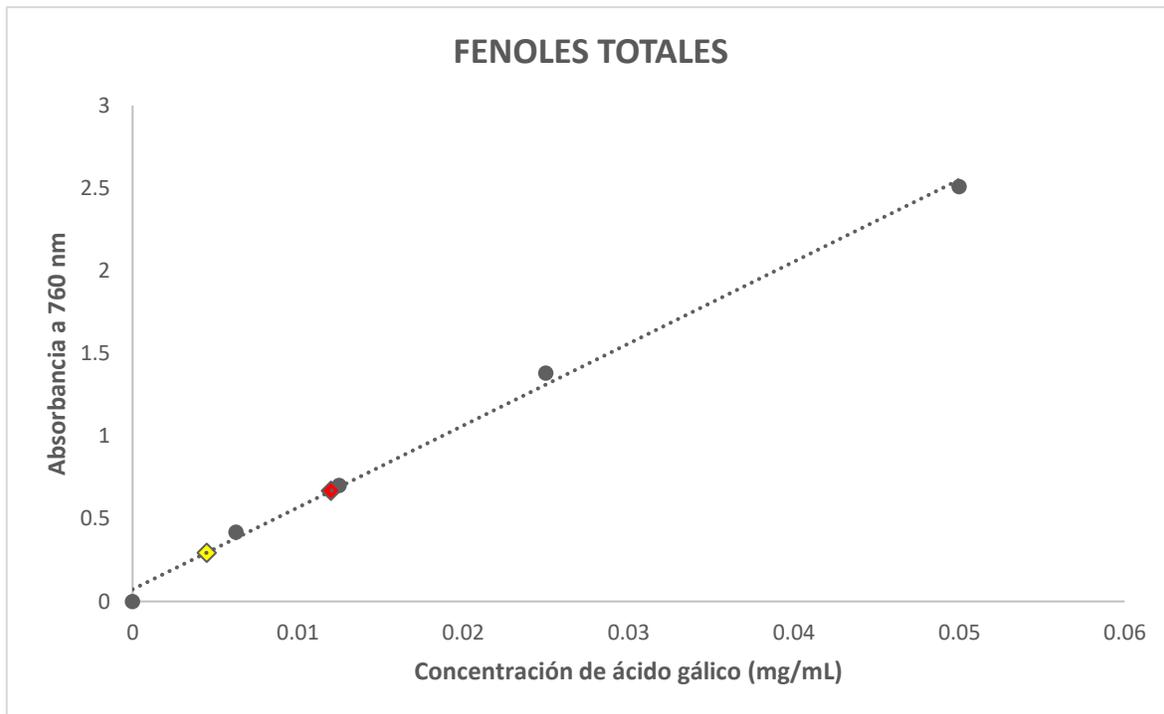


Figura 6. Curva patrón de ácido gálico [0.2 mg/mL], leída a 760 nm. En rojo se muestra el valor de la Miel 1 y en amarillo el valor de la Miel 2.

Determinación de flavonoides totales

La concentración de flavonoides presentes en la muestra de miel se calculó realizando una reacción con cloruro de aluminio y se midió la absorbancia a 450 nm e interpolando en una curva patrón de quercetina (Figura 7), se determinó que hay una concentración de 6.0549 mg eQ/100 g de flavonoides en la miel 1 y 3.0304 mg eQ/100 g en la miel 2.

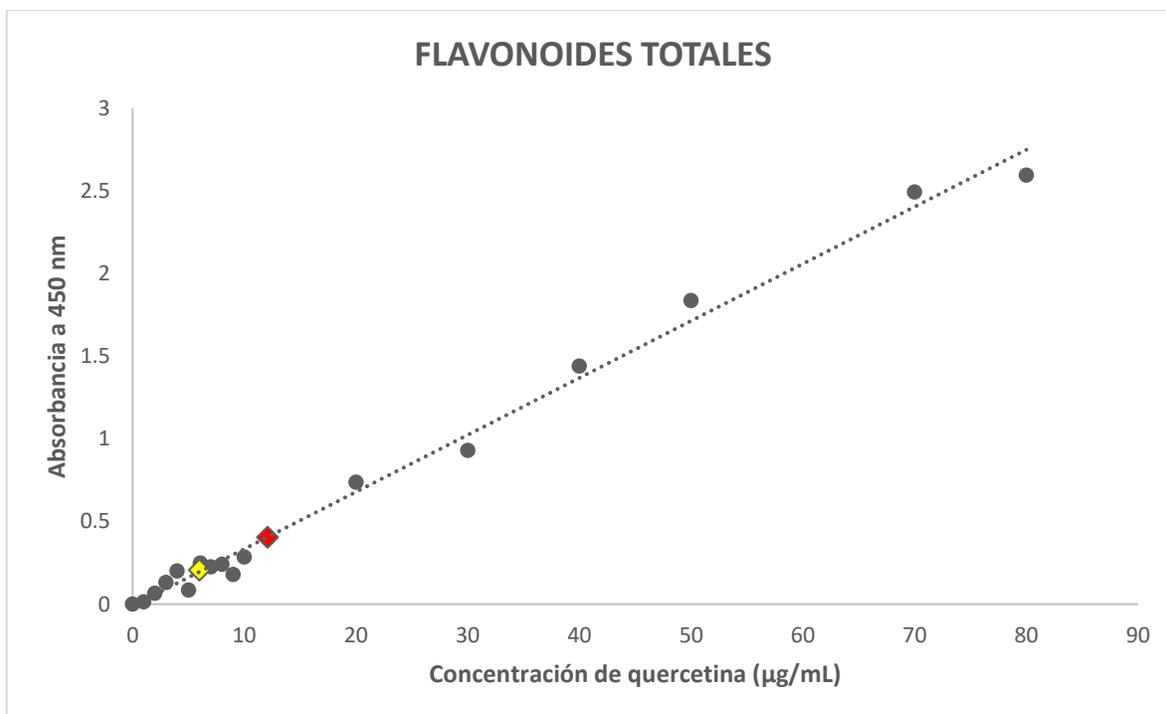


Figura 7. Curva patrón de quercetina [0-100µg/mL], a 450 nm. En rojo se muestra el valor de la Miel 1 y en amarillo el valor de la Miel 2.

Capacidad antioxidante

Evaluación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determinó a través de una reacción colorimétrica entre el radical DPPH y la miel, obteniendo los porcentajes de reducción de 37% y 42%, para la Miel 1 y la Miel 2, respectivamente, en la concentración más alta que fue de 1000 ppm (Figura 8 y 9).

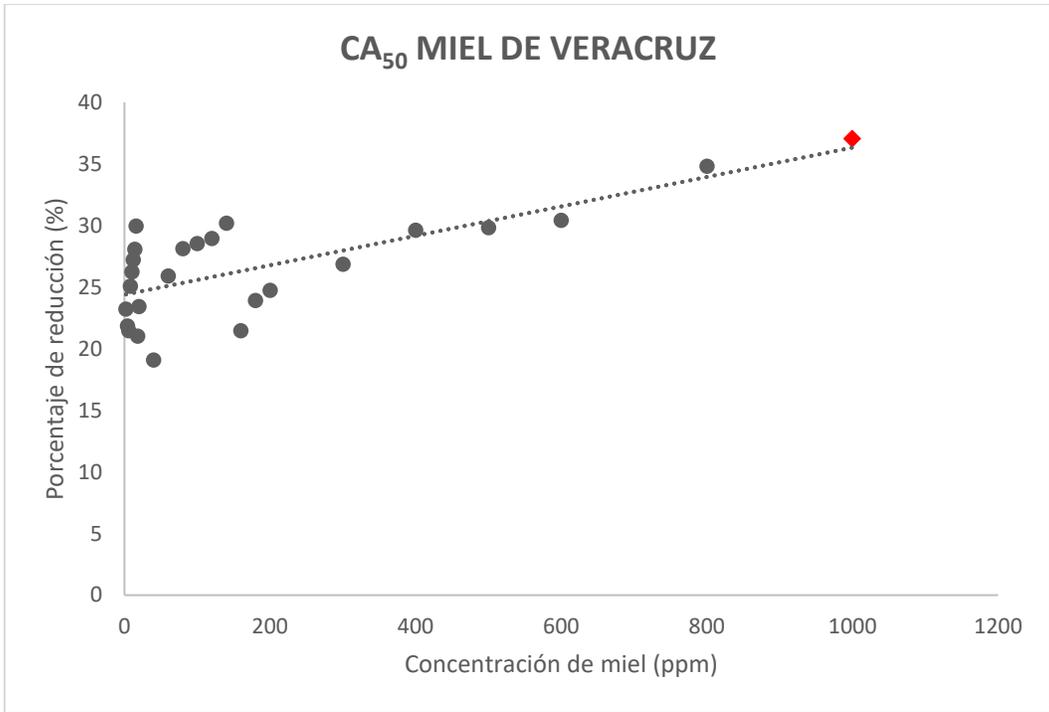


Figura 8. Capacidad antioxidante de la miel de Veracruz (miel 1), señalando el mayor porcentaje de reducción en rojo.

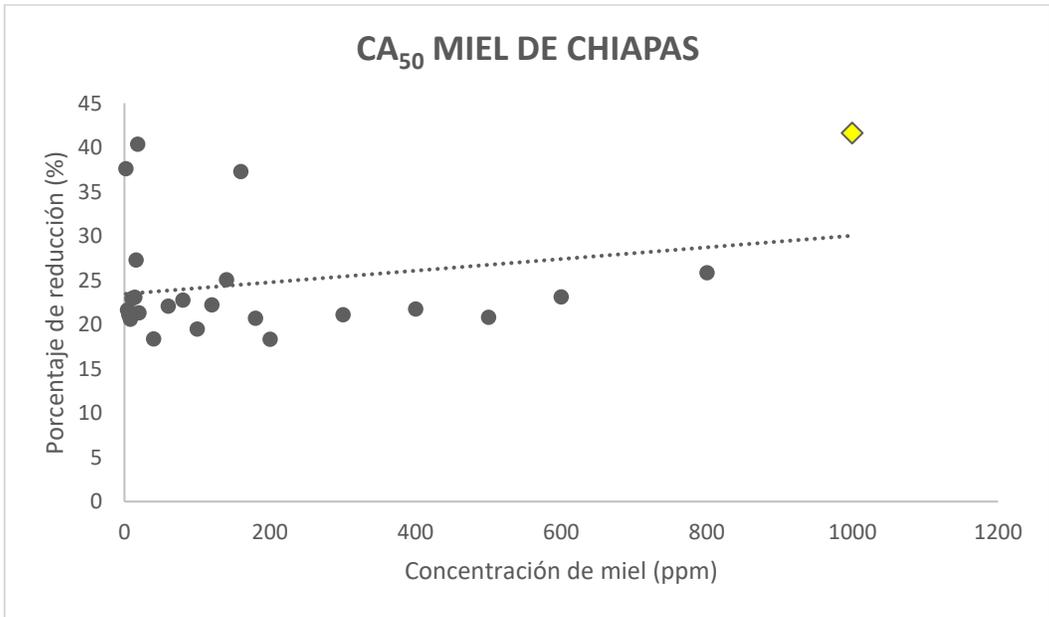


Figura 9. Capacidad antioxidante de la miel de Chiapas (miel 2), señalando el mayor porcentaje de reducción en amarillo.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

En este trabajo se observó una inhibición del crecimiento de las bacterias haciéndose evidente un halo menos turbio a comparación de las regiones de la placa donde no hubo interacción entre la miel y las bacterias (Figura 10). Como control positivo (C⁺) se utilizaron sensidiscos impregnados con 25 µg de Cloranfenicol y sus halos de inhibición se interpretan de acuerdo con los valores de referencia de la CLSI.

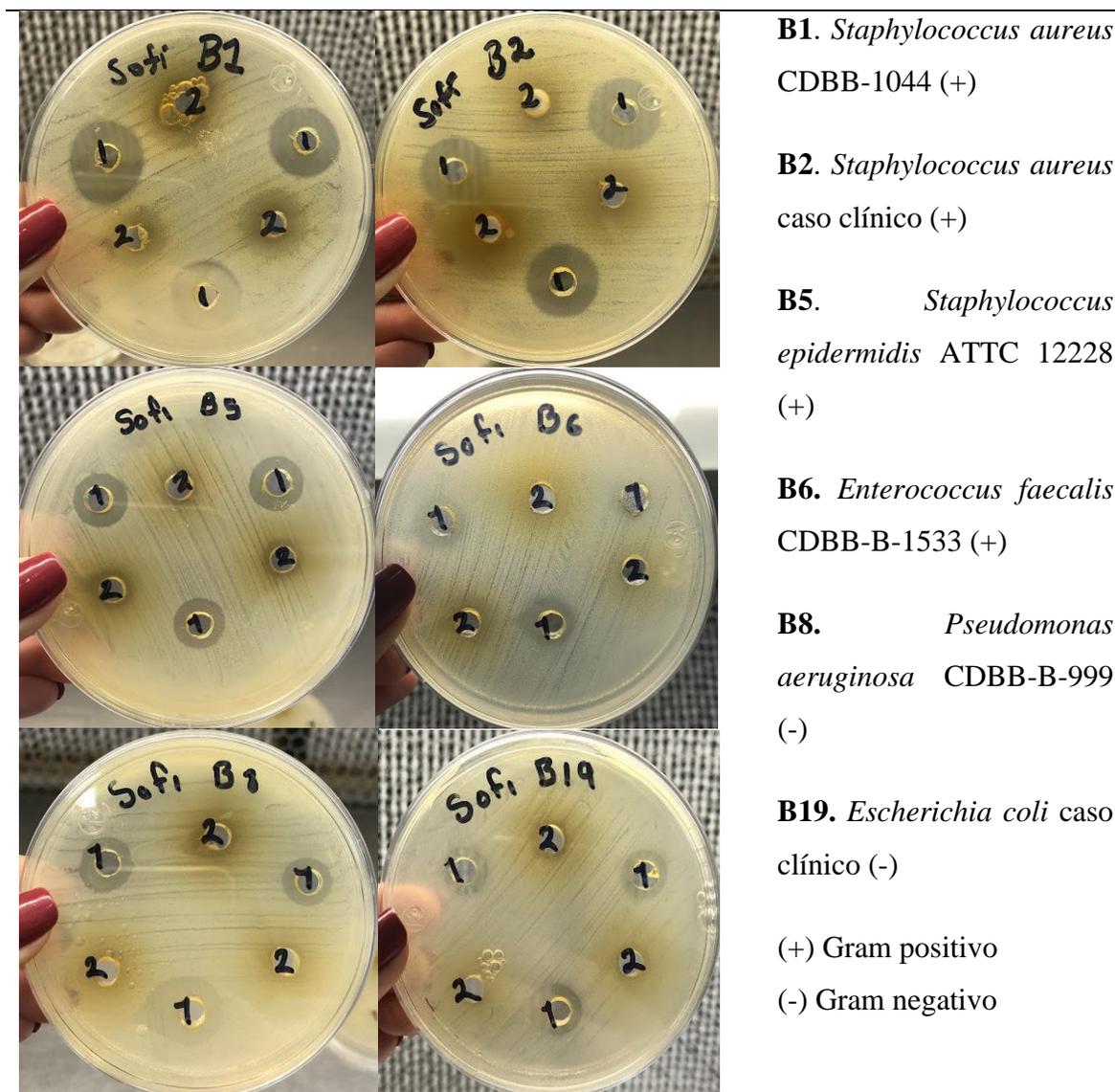


Figura 10. Halos de inhibición de los tratamientos de miel sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas de interés clínico. 1, miel de Chiapas (miel 2). 2, miel de Veracruz (miel 1).

El tamaño de los halos está reportado como el diámetro promedio de tres repeticiones en milímetros (mm). Esta prueba se analizó estadísticamente con un ANOVA de un factor

usando un $P < 0.05$ (Cuadro 3), cuyos resultados indican que existen diferencias significativas entre las muestras de miel y el control positivo (C^+) respecto a la inhibición de las bacterias.

Cuadro 3. Efectos de las muestras de miel sobre el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Organismo	Halos de inhibición (mm)		
	Miel 1	Miel 2	C^+
<i>Staphylococcus aureus</i> ⁺ CDBB-1044	9±1.4142	16.66±0.5773	21.66±0.5773 (S)
<i>Staphylococcus aureus</i> ⁺ Caso clínico	NA	18±1	30.33±0.5773 (S)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ⁺ ATCC 12228	8.33±0.5773	13±0.0	10.33±1.5275 (R)
<i>Enterococcus faecalis</i> ⁺ CDBB-B-1533	NA	12.33±1.1547	20.33±1.5275 (S)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ⁻ CDBB-B-999	10±1.7320	13.66±2.0816	18.33±1.1547 (S)
<i>Escherichia coli</i> ⁻ Caso clínico	8.33±1.1547	12±1.7320	24.33±0.5773 (S)

Los halos medidos están reportados en mm y es el valor promedio de 3 repeticiones por cepa. Simbología: No actividad (NA); Control positivo (C^+); Bacteria Gram positiva (+); bacteria Gram negativa (-), Resistente (R); Intermedio; Sensible (S). Análisis estadístico: ANOVA de un factor ($p > 0.05$) respecto al control positivo.

Tras realizar el análisis de varianza (prueba de Tukey), se encontraron diferencias significativas entre el efecto de las mieles y el del control positivo ($P = 0.0001$) sobre *S. aureus* CDBB-1044, siendo mayores los halos de inhibición del Cloranfenicol; también se encontró que existen diferencias significativas en los halos de inhibición entre las mieles, siendo la miel de Chiapas la que presentó halos de mayor diámetro ($P = 0.0004$) (Figura 11). En *S. aureus* caso clínico se observó lo mismo, existen diferencias significativas entre las mieles y el control positivo ($P = 0.0001$) y en los halos de inhibición entre las mieles ($P = 0.0001$).

En el caso de *S. epidermidis*, se encontró que existe diferencia significativa entre la miel de Chiapas (miel 2) y el control positivo ($P = 0.031$), siendo mayor el halo de inhibición de la

miel de Chiapas y de igual manera se encontraron diferencias significativas entre las mieles (P- 0.0022).

Respecto a *E. faecalis*, se encontraron diferencias significativas entre el efecto de las mieles y el del control positivo (P- 0.0003), siendo mayor el halo de inhibición del Cloranfenicol; también se encontraron diferencias significativas entre las mieles (P- 0.0001), señalando que la miel de Veracruz (miel 1) no presentó actividad sobre la bacteria.

Por otro lado, para *P. aeruginosa* se encontraron diferencias significativas entre las mieles con respecto al control positivo (P- 0.03), mientras que no se encontraron diferencias significativas entre las mieles (P- 0.085).

Finalmente, se encontraron diferencias significativas entre el efecto de las mieles y el control positivo sobre *E. coli*, de igual manera se encontraron diferencias significativas entre las mieles.

La miel de Chiapas fue la que presentó mejor actividad antimicrobiana, pues fue la que tuvo los halos de inhibición de mayor diámetro sobre todas las cepas evaluadas.

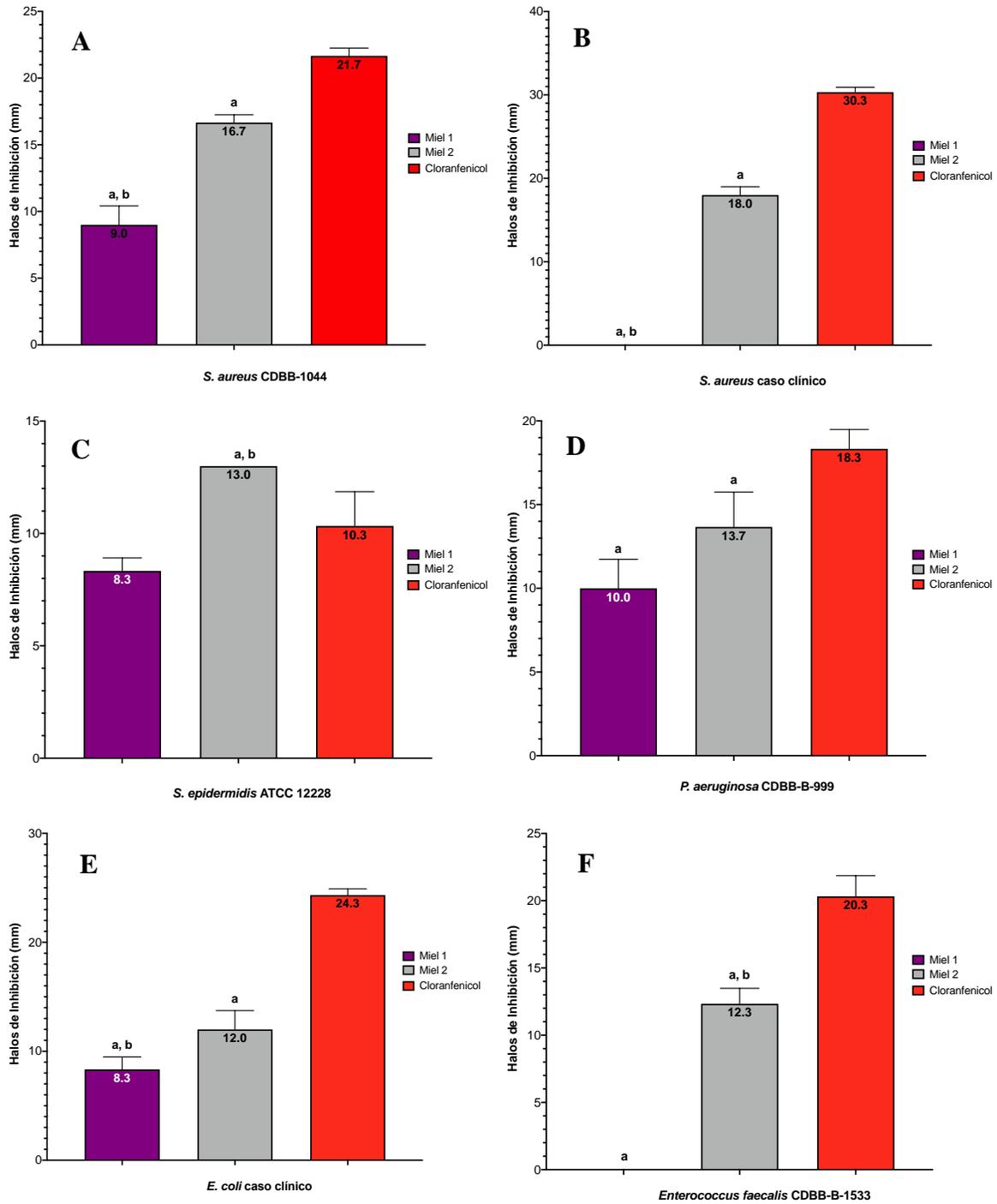


Figura 11. Halos de inhibición de los tratamientos de miel sobre las cepas de bacterias. A, *Staphylococcus aureus*. B, *S.aureus* caso clínico. C, *S.epidermidis*. D, *Pseudomonas aeruginosa*. E, *Escherichia coli*. F, *Enterococcus faecalis*. Los datos representan las medias de cada grupo. Se realizó ANOVA (Tukey) para determinar diferencias significativas entre los grupos.

Discusión

La miel es una sustancia de naturaleza dulce producida por las abejas (*Apis mellifera*), es rica en azúcares, principalmente fructosa y glucosa. Además, contiene una gran variedad de otros componentes, entre ellos ácidos fenólicos y flavonoides; vitaminas, tales como niacina, piridoxina y ácido ascórbico; enzimas como invertasa, fosfatasas, glucosa oxidasa y catalasa; carotenoides, ácidos orgánicos, aminoácidos, lípidos y proteínas; todos estos componentes influyen en la variedad, el color y el sabor de una miel (Viuda-Martos et al., 2010). Debido a su composición, la miel posee un gran potencial antimicrobiano, antioxidante, antiinflamatorio y cicatrizante, por lo que desde la antigüedad se ha utilizado como tratamiento natural ante diversos padecimientos.

En el presente trabajo se evaluaron las propiedades organolépticas, fisicoquímicas, actividad antioxidante y antimicrobiana de dos mieles provenientes de diferentes regiones de México.

Los resultados encontrados en el estudio organoléptico indican que existen diferencias en las características sensoriales entre las muestras de miel proveniente del estado de Veracruz (Miel 1) y el estado de Chiapas (Miel 2). La miel 1 tuvo un sabor dulce con notas ácidas, una consistencia fluida y de acuerdo con el fotómetro, un color ámbar oscuro. Respecto al aroma, se catalogó como “característico de la miel”, pues la información proporcionada por el apicultor indicaba que esta miel fue colectada en una zona de cafetales y árboles de mango, sin embargo, no se percibió ningún olor particular. Por otro lado, la miel 2 tuvo un sabor dulce con toques cítricos, una consistencia fluida, un aroma a resina y de acuerdo con el fotómetro un color ámbar. Las características anteriormente mencionadas cumplen con las especificaciones sensoriales que establece la Norma Oficial Mexicana de la miel (NOM-004-SAG/GAN-2018).

Además, Grajales-Conesa y colaboradores en 2013, reportaron valores promedio de 80.5, 55.75 y 41 mm PFUND para mieles del estado de Chiapas, clasificándolas con un color ámbar, ámbar claro y ámbar extra claro, respectivamente; por lo que son resultados similares con el color (ámbar) determinado de la miel de Chiapas evaluada en el presente trabajo.

Respecto al pH, ambas mieles presentaron un pH ácido, aunque la miel de Altotonga, Veracruz (miel 1) fue menos ácida presentando un valor de 5.09, mientras que la miel de Chiapas (miel 2) presentó un valor de 3.9. El pH está asociado al contenido de ácidos orgánicos, los cuales reflejan la acidez de la miel; en el presente trabajo se encontró 1.3 meq Ác.O/Kg para la miel 1 y 0.32 meq Ác.O/Kg para la miel 2, por lo que para ambas mieles, el contenido de ácidos orgánicos cumple con el requisito de calidad de la Norma Oficial Mexicana de la miel (NOM-004-SAG/GAN-2018), donde se especifica que el contenido de ácidos no debe sobrepasar de 50 meq Ác.O/Kg.

Zavala-Olalde et al., (2013) realizaron la caracterización de cuatro mieles tropicales de México y Guatemala, y encontraron que la miel monofloral de “campanilla” (*Ipomoea purpurea*) presentó un pH promedio de 3.58, coincidiendo con el pH de la miel 2 del presente trabajo, pues de acuerdo con el apicultor, dicha miel también tiene como principal fuente floral a *Ipomoea purpurea*. Además, encontraron un contenido de 39.52 meq/Kg de ácidos orgánicos para la misma miel de “campanilla” y evidentemente la cantidad fue mayor a la encontrada en la miel 2 de este trabajo, sin embargo, ambas cantidades cumplen con el requisito de calidad de la Norma Oficial Mexicana de la miel (NOM-004-SAG/GAN-2018) y se debe tener en cuenta que cada miel varía en el contenido de ácidos orgánicos, pues Atrouse et al, (2004) señalan que el pH de la miel no refleja directamente el contenido total de ácidos orgánicos, sino que refleja la acción amortiguadora de los cationes inorgánicos constituyentes sobre los ácidos orgánicos presentes.

Por otro lado, Dávila et al., (2020) realizaron una determinación fisicoquímica de miel de abeja producida en el Municipio de Tepatlaxco, Ver., envasada en vidrio y PET, encontrando que la miel, dependiendo del envasado y el tiempo pasado desde que se enfrascó, aumentó su pH en un rango de 4.0 a 5.3, coincidiendo así con el pH observado en la miel 1 (5.09) del presente trabajo. Respecto al contenido de ácidos orgánicos no se encontró literatura de la región referente a ellos, pero cabe aclarar que la presencia de una mayor cantidad de ácidos orgánicos en la miel 1 respecto a los encontrados en la miel 2, puede deberse al color de esta, pues de acuerdo con Mato (2004) las mieles más oscuras, son las que presentan una acidez más elevada, es decir, mayor contenido en ácidos orgánicos.

La humedad es una característica importante en la miel, pues influye en la estabilidad de la misma frente a la fermentación (Mato, 2004), así como en otras propiedades como son la viscosidad, densidad, color y osmolaridad, esta última relacionada con la actividad antimicrobiana. Esta propiedad fue medida con un refractómetro Repo-4, encontrando para la miel 1 un contenido de humedad de 16.9% y para la miel 2 un contenido de 13.1%. De acuerdo con los límites de humedad que dicta la Norma Oficial Mexicana de la miel (NOM-004-SAG/GAN-2018), una miel de calidad no debe rebasar el 20% de humedad, por lo que se considera que las muestras de miel analizadas en este trabajo, al estar dentro del límite establecido, cumplen con este requisito de calidad.

La mayor parte de la composición de la miel está constituida por los carbohidratos, pues representan hasta un 82% de sus componentes (Mato, 2004), siendo los monosacáridos fructosa (33-42%) y glucosa (27-45%) los más abundantes, y cerca del 10-15% son disacáridos y pequeñas cantidades de otros azúcares (Lobos y Pavez, 2021). El contenido de sólidos totales disueltos expresado como °Brix está representado por los azúcares solubles totales, que son las sustancias sólidas solubles más abundantes en las soluciones de miel (Dobrinás et al., 2022). Al igual que la humedad, esta propiedad fue medida con un refractómetro Repo-4, encontrando un contenido de 81.4% para la miel 1 y 81.8% para la miel 2. Estos valores concuerdan con los reportados para otro tipo de mieles. En el estudio realizado por Mondragón-Cortez et al., (2013) el contenido de sólidos totales disueltos de las muestras de miel de la región occidental de México osciló entre 79.1 y 81.7 °Brix, mientras que Dobrinás et al., (2022) reportaron para unas muestras de miel de Rumania que el contenido de sólidos totales disueltos osciló entre 76.5% y 81%.

De los azúcares totales, en las muestras de miel evaluadas en el presente trabajo, se determinó una concentración de fructosa de 50.8% para la miel 1 y 57.8% para la miel 2. En un estudio sobre los azúcares y °Brix en miel de *Apis mellifera*, *Melipona beecheii* y miel comercial del mercado local en México, Castillo-Martínez et al., (2022), reportan un contenido que oscila de 31.9 a 41.6 de fructosa para las muestras de miel de *Apis mellifera*, mientras que 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 fructosa que oscila de

18.61 a 45.34% para las muestras de miel de *Apis mellifera*, valores cercanos a los encontrados en este estudio.

Cabe mencionar que el ángulo de rotación tiene que ver con la determinación de concentración de fructosa, pues de acuerdo con Salamanca y Osorio, (2016), el signo “+” significa una rotación hacia la derecha y el signo “-” indica una rotación hacia la izquierda, y hay que recordar que el monosacárido fructosa tiene un ángulo de rotación antihoraria, es decir, su rotación es hacia la izquierda.

Finalmente, se encontró un contenido de 84.31% para la miel 1 y un 81.64% para la miel 2 de azúcares reductores, valores ligeramente altos a los reportados por Zavala-Olalde et al., (2013) en la caracterización de cuatro mieles tropicales de México y Guatemala, pues en dicho estudio, para la miel de campanilla reportaron un contenido de 71.16%; y para la otra miel mexicana un contenido de 74.41%. Cabe mencionar que la NOM-004-SAG/GAN-2018, establece un contenido mínimo de 60% de azúcares reductores, por lo que las mieles evaluadas en el presente estudio cumplen con este criterio de calidad.

Otro de los componentes que conforman la miel son las proteínas. La principal fuente de proteínas es el polen, aunque las abejas también contribuyen a modificar este perfil a través de la regurgitación (Ranneh et al., 2021). El contenido de proteínas se encuentra en menor proporción en la composición de la miel, de hecho, no hay referencia de las cantidades de éstas que la miel debe tener en las normas oficiales de calidad, sin embargo, el National Honey Board (2005) refiere que se encuentran en una proporción cercana al 0.266%. En las muestras analizadas se encontró un porcentaje de proteínas de 0.0772% para la miel 1 y 0.0665% para la miel 2; cantidades menores al promedio que indica el National Honey Board (2005), sin embargo, son similares a los valores reportados por Dobrinas et al., (2022), donde encontraron un rango entre 0.0437 y 0.2627 % en las muestras de miel que analizaron, atribuyendo las diferencias de dichos resultados a la presencia de proteínas derivadas del néctar de flores o enzimas introducidas por las abejas en los productos, además que puede variar dependiendo de la fuente floral, lo anterior también es válido para el presente trabajo.

En algunas ocasiones la miel contiene compuestos que las plantas generan como mecanismos de defensa en respuesta a factores de estrés bióticos y abióticos. Unos de estos compuestos

son los alcaloides, los cuales, junto con los fenoles y flavonoides, son metabolitos secundarios que las plantas utilizan para protegerse de depredadores como animales herbívoros, insectos y algunos microorganismos (Alvarado-Ávila et al., 2022). En el presente trabajo primero se realizó una prueba cualitativa para saber si en las muestras de miel se encontraba la presencia de dichos compuestos, dando un presunto positivo, sin embargo, después de realizar la cuantificación utilizando buffer de fosfato y verde de bromocresol, los resultados fueron negativos. Lo anterior puede deberse a la fuente floral de la miel, pues la cantidad de componentes alcaloideos va a variar dependiendo la especie de planta; además, cabe mencionar que la ausencia de estos compuestos es algo positivo, ya que de lo contrario la miel podría considerarse tóxica, pues el consumo de alimentos que contengan alcaloides puede provocar efectos dañinos en la salud humana, desde daño hepático, así como daños menores en riñón, páncreas, tracto gastrointestinal, etc (Alvarado-Ávila et al., 2022).

La capacidad antioxidante que posee la miel depende principalmente de su origen botánico (Gheldof et al., 2002) y se le es atribuido a compuestos que forman parte de su composición química, como fenoles, flavonoides, proteínas, aminoácidos, enzimas (glucosa-oxidasa, catalasa...), ácidos orgánicos y vitaminas como el ácido ascórbico (Ramos y Pacheco, 2016). El ácido ascórbico es considerado uno de los agentes antioxidantes más potentes del organismo, además de estar implicado en la síntesis de colágeno y en una variedad de funciones inmunológicas y antibacterianas (Zago et al., 2010). Es una vitamina esencial, es decir, es necesaria para que el cuerpo funcione, además es hidrosoluble y es sintetizada químicamente a partir de glucosa, mediante una serie de reacciones catalizadas por enzimas, siendo la L-gulono- γ -lactona oxidasa (GLO) la última enzima involucrada en su síntesis (Marcelo y Analía, 2007).

De acuerdo con Ramos y Pacheco, (2016), el contenido promedio de ácido ascórbico en 100 g de miel es de 2.2 a 2.4 mg, sin embargo, en el presente trabajo se encontró un contenido de 307.768595 mg/100g para la miel 1 y 70.148760 mg/100g para la miel 2, cantidades evidentemente mayores al promedio, lo cual se respalda con la información proporcionada por Zago et al., (2010), pues mencionan que las mieles oscuras son más ricas en vitaminas B₁ y C. Además, Tauguin et al., (2005), realizaron un análisis de niveles de concentración de vitamina C en mieles de la provincia del Chaco, Argentina, donde encontraron

concentraciones desde 58 hasta 90 mg/100 g; y Zago et al., (2010) determinaron el contenido de vitamina C en miel de abejas venezolanas, encontrando concentraciones de 12.74 a 40 mg/100 g; ellos asumen que estos valores se deben a las diferentes fuentes florales y la época de recolección, lo cual también es válido para el presente trabajo.

La composición fenólica en la miel también está determinada por el origen floral; los compuestos fenólicos forman parte de los metabolitos secundarios presentes en las plantas y se caracterizan por la presencia de múltiples grupos fenólicos que están asociados a estructuras más o menos complejas (Martín, 2018). Estos compuestos han sido asociados como los principales responsables de la actividad antioxidante de la miel por su capacidad para eliminar radicales libres (Sakika et al., 2022). Los compuestos fenólicos estabilizan los radicales libres cuando desprenden hidrógeno de uno de sus grupos hidroxilo; el grado de actividad está relacionado con el número de sus grupos hidroxilo (Cianciosi et al., 2018).

En las muestras de miel analizadas, las concentraciones de fenoles fueron de 160 mg eAG/100 g para la miel 1 y 60 mg eAG/100 g para la miel 2. Contreras-Martínez et al., (2020), realizaron un estudio sobre la capacidad antioxidante y contenido fenólico de cinco muestras de miel de Zacatecas, México, encontrando concentraciones que oscilan de 50.47 a 102 mg eAG en 100 gramos de miel; valores similares a los encontrados en el presente estudio. Por otro lado, Tapia-Campos et al., (2017), realizaron una caracterización fisicoquímica y determinaron el contenido fenólico de miel de *Apis mellifera* del sur de Jalisco, México, encontrando valores que oscilan de 68.55 a 94.21 mg eAG en 100 gramos de miel; dichos valores fueron encontrados en mieles color ámbar oscuro, siendo estos más bajos que el valor reportado para la miel 1 del presente trabajo. Además, para las mieles color ámbar, los valores oscilaron entre 62.13 a 136.84 mg eAG/100 g; valores ligeramente más altos que el encontrado para la miel del mismo color (miel 2) del presente trabajo. Esto último puede deberse principalmente al origen floral y geográfico, además de la época de colecta y el tipo de almacenamiento de las diferentes muestras de miel, pues todos esos factores influyen en el contenido de los compuestos fenólicos de la miel.

Los flavonoides forman parte de los polifenoles presentes en la miel, estos son compuestos de bajo peso molecular y principalmente solubles en agua, además son componentes que influyen en el aroma y la propiedad antioxidante que posee la miel (Moniruzzaman et al.,

2014). Se clasifican según el grado de oxidación del anillo C, siendo las flavonas, flavanoles y flavonoles los más abundantes en la miel (Cianciosi et al., 2018).

Hernández-Fuentes et al., (2021), realizaron una caracterización del contenido total de fenoles y flavonoides, color y propiedades funcionales de muestras de miel con diferentes orígenes florales del estado de Hidalgo, México, encontrando valores que oscilan de 3.04 a 7.01 mg eQ/100 g para mieles ámbar oscuro y 1.28 a 7.63 mg eQ/100 g para mieles color ámbar; estos valores son cercanos a los determinados para las muestras de miel del presente trabajo, pues se encontró un contenido de 6.0549 mg eQ/100 g de flavonoides en la miel 1 y 3.0304 mg eQ/100 g en la miel 2. Cabe mencionar que el contenido de flavonoides, así como los compuestos anteriormente mencionados en el trabajo, también dependerá del origen floral y geográfico de las muestras de miel, al igual que por el clima y las condiciones ambientales como humedad, temperatura y tipo de suelo donde crecieron las plantas de las cuales las abejas obtuvieron el néctar.

Se puede definir al estrés oxidativo como un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, y puede afectar diversas funciones fisiológicas (Cianciosi et al., 2018). El exceso de radicales libres en el sistema celular puede causar daño oxidativo a las células y provocar que las macromoléculas esenciales como las nucleicas y los aminoácidos, proteínas y lípidos se descompongan, lo cual puede conducir al desarrollo de enfermedades como el cáncer, trastornos metabólicos y disfunción cardiovascular (Sakika et al., 2022). Es por ello, que en la actualidad se ha buscado contrarrestar estos efectos mediante la ingesta de alimentos que contengan compuestos antioxidantes.

La capacidad antioxidante de las muestras de miel evaluadas en este estudio se llevó a cabo mediante la reducción del radical DPPH, obteniendo un porcentaje de reducción promedio de 37% para la Miel 1 y un 42% para la Miel 2 en la concentración más alta utilizada en este trabajo (1000 ppm). Estos resultados se pueden considerar bajos comparados con los reportados por Moniruzzaman et al., (2014), en el estudio que realizaron para identificar ácidos fenólicos y flavonoides en miel monofloral de Bangladesh y donde determinaron la capacidad antioxidante de la misma, pues para una de las muestras de miel reportan un porcentaje de reducción de 76.68%, sin embargo, la actividad media para el resto de las muestras fue de 36.95%, siendo este último valor similar a lo encontrado en el presente

estudio. Por otro lado, Tapia-Campos et al., (2017), reportan un porcentaje de reducción de entre 21.1 a 27.9% en miel ámbar oscuro y 22.2 a 29.2% en miel ámbar, ambas de Jalisco, México.

Debido a que los fenoles, flavonoides y el ácido ascórbico, son los compuestos a los que se les atribuye la mayor parte de la capacidad antioxidante de la miel, es de esperar que la muestra de miel 1 que presentó mayor contenido de estos, presente mayor capacidad antioxidante, sin embargo, en este caso la muestra de miel 2 presentó mayor capacidad aun teniendo menor contenido de los compuestos mencionados, lo cual puede deberse al tipo de flavonoides que se encuentran en cada miel, ya que la acción antioxidante de los flavonoides depende principalmente de su capacidad de reducir radicales libres y quelar metales, impidiendo las reacciones catalizadoras de los radicales libres (López, 2002). Además, Gheldof et al. (2002) consideran que los niveles de fenoles y flavonoides en la miel son demasiado bajos para tener un significado antioxidante individual importante, por lo que concluyen que esta capacidad es el resultado de la actividad conjunta y de las interacciones que existen entre diferentes componentes, incluidos fenoles y flavonoides, ácido ascórbico, proteínas y aminoácidos, enzimas como glucosa-oxidasa y catalasa, ácidos orgánicos, entre otros.

La actividad antimicrobiana que presenta la miel se ha observado desde hace miles de años, pues se recomendaba como tratamiento para diversos padecimientos, por ejemplo, en la antigua Grecia, donde se recomendaba su uso tópico para curar infecciones y heridas (Ulloa et al., 2010). Esto se debe al conjunto de las características fisicoquímicas que la componen, como su contenido en azúcares y ácidos orgánicos, a su pH ácido, alta osmolaridad y formación de peróxido de hidrógeno. El efecto osmótico de la miel procede de los monosacáridos, esencialmente fructosa y glucosa, las que interaccionan con las moléculas de agua que contienen las bacterias, mientras que el peróxido de hidrogeno, se presenta agresivo contra las bacterias y se atribuye al sistema glucosa-oxidasa/catalasa (García-Chaviano et al., 2022).

En este trabajo, la actividad antimicrobiana de las dos mieles fue evaluada contra bacterias Gram positivas y Gram negativas de interés clínico (Cuadro 3), encontrando que la miel de Chiapas (Miel 2) fue la más efectiva, pues todas las bacterias probadas tuvieron una

inhibición en su crecimiento e incluso presentó un halo de inhibición mayor al del control positivo (Cloranfenicol) sobre *S. epidermidis*; por otro lado, la miel de Veracruz (Miel 1), presentó efecto sobre todas las cepas evaluadas excepto *S. aureus* y *E. faecalis*. Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antimicrobiana indican que, si bien los compuestos químicos que conforman a la miel como son los ácidos orgánicos, fenoles, flavonoides y ácido ascórbico, son a los que se les otorga la mayor parte de su actividad antimicrobiana, no son los principales agentes para esta propiedad; el pH y la humedad también juegan un papel importante para la actividad antimicrobiana de la miel, pues en el caso de la miel de Chiapas (Miel 1), al presentar un pH más ácido (3.9) y una humedad más baja (13.1%) que la miel de Veracruz (Miel 2), desfavorece el crecimiento bacteriano, pues las bacterias como las que se evaluaron en este trabajo suelen tener un crecimiento óptimo en ambientes con pH promedio de 6 , y con humedad alta (Caycedo et al., 2021). Por lo tanto, la actividad antimicrobiana de la miel se debe a la interacción de todos los elementos intrínsecos que la componen como los ácidos orgánicos, carbohidratos reductores, proteínas, ácido ascórbico, fenoles y flavonoides, al igual que su pH, contenido de humedad, densidad, sólidos disueltos, entre otros; y también dependerá del origen botánico del cual provenga la miel.

Además, cabe resaltar la diferencia de las bacterias Gram positivas con las Gram negativas; las primeras poseen una pared celular de peptidoglicano que está situada por encima de la membrana plasmática; y las segundas tienen una pared celular más compleja, pues poseen una capa de peptidoglicano que está rodeada por una membrana externa que actúa como una barrera adicional (Prescott et al., 2004). Por lo anterior, las bacterias Gram positivas pueden ser más vulnerables a los efectos antimicrobianos de la miel, ya que ésta puede atravesar la pared celular de las bacterias Gram positivas más fácilmente debido a su estructura más simple y, por lo tanto, puede ejercer un mayor efecto antibacteriano. Ahora, en el caso de las bacterias Gram negativas al tener una estructura más compleja las hace menos susceptibles a la acción de la miel.

Sin embargo, es importante destacar que la miel aún puede tener algún grado de efecto inhibitorio sobre bacterias gramnegativas, como lo que se observó en el presente trabajo y de igual manera, puede no inhibir el crecimiento sobre algunas bacterias grampositivas como en

el caso de la Miel 1 que no presentó efecto sobre la cepa de caso clínico de *Staphylococcus aureus*, lo que puede deberse a la resistencia que han desarrollado algunas bacterias a los agentes antimicrobianos.

En un estudio de evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja de Costa Rica contra diferentes bacterias, realizado por Estrada et al., (2005), encontraron que la miel presentó un alto efecto antimicrobiano sobre *S. aureus*, *S. epidermis*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, dando argumento a que *S.aureus* se ha reportado anteriormente como una cepa sensible a la miel.

Por otro lado, Zamora y Arias, (2011), realizaron un estudio acerca de la actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes*, donde encontraron que hubo mayor inhibición en *Staphylococcus aureus* y en *S. epidermis*, siendo así el género que presentó mayor susceptibilidad a la miel de abeja. Esto último coincide con el resultado de la Miel 2 sobre las cepas del mismo género, además que se respalda con estudios anteriores donde reportan mayor susceptibilidad de *S. aureus* a la miel.

Conclusiones

- Las dos muestras de miel presentaron actividad antimicrobiana, siendo la Miel 2 la que inhibió el crecimiento de todas las cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas evaluadas.
- Debido a las características organolépticas y químicas, así como su capacidad antioxidante y su actividad antimicrobiana de cada una de las muestras de miel, se pueden considerar como un alimento funcional y como un buen tratamiento alternativo a los fármacos.

- Las propiedades organolépticas, físicas y químicas de las dos muestras de miel evaluadas, cumplen con los parámetros de calidad establecidos dentro de la NOM-004-SAG/GAN-2018.
- Cada muestra de miel presenta características y propiedades particulares.
- Las dos muestras de miel presentan capacidad antioxidante, variando ligeramente en el porcentaje de reducción.

Apéndice I. Parámetros de calidad de la miel, estudio organoléptico.

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana de la miel (NOM-004-SAG/GAN-2018), las especificaciones que el producto Miel debe cumplir son las siguientes:

Especificaciones sensoriales

Color: Propio característico derivado de la vegetación de origen, variable de: blanco agua, extra blanco, blanco, ámbar extra claro, ámbar claro, ámbar y oscuro.

Olor: Propio característico derivado de la vegetación de origen.

Sabor: Propio característico derivado de la vegetación de origen.

Consistencia: Fluida, viscosa, total o parcialmente cristalizada.

Cuadro 4. Especificaciones fisicoquímicas de la miel.

Especificaciones	Mínimo	Máximo
Contenido aparente de azúcar reductor expresado como % (g/100g) de azúcar invertido	60	-
Contenido de fructosa y glucosa (suma de ambas) (g/100g)	60	
Contenido de sacarosa % (g/100g)	-	5.00
Humedad % (g/100g)	-	20.00
Sólidos insolubles en agua % (g/100g)	-	0.1
Conductividad eléctrica (mS/cm)	-	0.80
Ácidos libres, expresado en miliequivalentes de ácido/Kg	-	50.00
Hidroximetilfurfural (HMF) expresado en mg/Kg de miel de origen declarado procedente de regiones de clima tropical	-	80.00
Hidroximetilfurfural (HMF) expresado en mg/Kg de miel en general.	-	40.00
Índice de diastásico de miel en general (unidades Schade)	-	8.00*

*Para las mieles con bajo contenido enzimático y un contenido de HMF no superior a 15 mg/ Kg, el índice mínimo de distasa en unidades Schade será de 3.0.

Apéndice II. Cuantificación de Ácidos Orgánicos

Esta técnica se basa en que las reacciones ácido-base son reacciones de equilibrio homogéneo (neutralización) entre un ácido y una base produciendo una sal más agua.

Procedimiento:

1. Pesarse 1 g de miel y diluirlo en 10 mL de agua destilada, adicionar 5 gotas de la solución de fenolftaleína.
2. Montar en un soporte una bureta de 20 mL cargada con la solución de NaOH 0.01 N.
3. Proceder a titular la muestra problema, registrar el primer vire estable durante un minuto y anotar la cantidad de NaOH gastado.

Los resultados se interpretan de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

C₁ = Concentración del titulante de NaOH.

V₁ = Volumen de NaOH gastado.

C₂ = Concentración de ácidos orgánicos de la muestra problema.

V₂ = Volumen de la muestra problema.

(González y Peñalosa, 2000).

Apéndice III. Cuantificación de carbohidratos reductores por la técnica de Nelson-Somogyi

Extracción de carbohidratos de una muestra de miel.

1. Preparar etanol al 80%.
2. Colocar el etanol al 80% en un baño de hielo.
3. Pesar 10 mg de miel y agregar 2 mL de etanol frío al 80%.
4. Enfriar en un baño de hielo por 15 min.
5. Centrifugar a 10000 rpm por 15 min.
6. Decantar y conservar el sobrenadante.
7. Evaporar el etanol del sobrenadante.
8. Reconstituir con 5 mL de agua destilada.

Cuantificación de carbohidratos

Los azúcares reductores como la glucosa reaccionan con el reactivo de cobre ($\text{CuSO}_4 \bullet 5\text{H}_2\text{O}$) formando óxido cuproso de color rojo, debido a la donación de electrones del azúcar al ion oxidante. El óxido cuproso precipitado insoluble no puede valorarse fotométricamente, por lo que se trata con el reactivo de arsenomolibdato que lo transforma en un ion verdoso, cuya absorbancia 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.

La curva patrón que se utiliza para la cuantificación está expresada en el cuadro 5.

Cuadro 5. Curva patrón para la cuantificación de carbohidratos por el método de Nelson-Somogyi.

	1	2	3	4	5	6
Patrón de glucosa (mL)	--	0.25	0.50	0.75	1.0	--
Agua destilada (mL)	1.0	0.75	0.50	0.25	--	--
Problema (mL)	--	--	--	--	--	1.0

Reactivo de cobre

1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
-----	-----	-----	-----	-----	-----

Una vez dispuestos los tubos de la curva se procede con lo siguiente:

1. Tapar firmemente los tubos con papel aluminio y colocar en baño maría hirviendo por 20 minutos. Después, enfriar con agua corriente.
2. Agregar a cada tubo 1 mL del reactivo de arsenomolibdato.
3. Agregar a cada tubo 7.5 mL de agua destilada.
4. Mezclar por inversión cada tubo y leer en el espectrofotómetro a 565 nm.

Patrón de glucosa (200 µg/mL)

Disolver 1 mg de glucosa en 5 mL de agua destilada.

Reactivo de cobre

400 mL de agua destilada + 40 g de carbonato de sodio anhidro y disolver. Agregar 7.5 g de ácido tartárico y disolver. Enfriar si es necesario. Agregar 4.5 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y disolver. Aforar a 1 L y envasar en frasco ámbar. Dejar madurar por 2 semanas.

Reactivo de arsenomolibdato.

Disolver 50 g de molibdato de amonio en 900 mL de agua destilada, agregar 42 mL de H_2SO_4 concentrado lentamente y añadir 50 mL de solución de ortoarseniato disódico al 12% (NaHA_5O_4). Mezclar e incubar a 37°C durante 48 horas. Envasar en frasco ámbar.

(González y Peñalosa, 2000)

Apéndice IV. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Esta técnica está basada en la formación de un complejo entre el colorante azul brillante de Coomassie G-25 y los residuos de Arg, Trp, Tyr, His y Phe de las proteínas, lo que provoca un cambio de color rojo a color azul, que tiene una absorbancia máxima a 595 nm.

Para la extracción se pesa 1 g de miel y se homogeniza con 4 mL de una mezcla de metanol-cloroformo-agua (12:5:3), en un baño de hielo. Se procede a centrifugar a 4500 rpm por 10 minutos, después se le agrega 1 mL de cloroformo y 1.5 mL de agua destilada al sobrenadante, se centrifuga por segunda vez y se utiliza como patrón albúmina 100 µg/mL.

La solución stock de albúmina se prepara disolviendo 10 mg albúmina bovina sérica en 1 mL de PBS, y posteriormente, se hace una disolución seriada para alcanzar una concentración de 10 µg/mL.

Se recupera el sobrenadante para realizar la cuantificación por el método de Bradford, y se realiza la serie de tubos indicada en el cuadro 6.

Cuadro 6. Curva patrón para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

	1	2	3	4	5	6	7	Problema
Albúmina (µg)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0.1	--	--
Stock de albúmina (µL)	100	80	60	40	20	10	--	--
PBS (µL)	60	80	100	120	140	150	160	150
Reactivo de Bradford(µL)	40	40	40	40	40	40	40	40
Sol. Problema (µL)	--	--	--	--	--	--	--	10

*Las cantidades pueden variar

Las reacciones son llevadas a cabo en una placa de ELISA y se leen en el espectrofotómetro a 595 nm.

Reactivo de Bradford:

Pesar 100 mg de azul de Coomasie G-250 y se disuelven en 50 mL de etanol al 96%. Agregar 100 mL de ácido fosfórico al 85%, aforar a 1L con agua destilada, filtrar y almacenar en frasco ámbar, madurar durante 12 horas.

(García y Vázquez, 1998)

Apéndice V. Cuantificación de vitamina C (ácido ascórbico) con reactivo de Folin-Ciocalteu.

Extracción del ácido ascórbico de una muestra de miel.

1. Pesar 1g de miel y añadir 4 mL de TCA (ácido tricloroacético) al 10%.
2. Agitar vigorosamente hasta alcanzar un homogenizado y colocar en baño de hielo por 5 minutos.
3. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos y recuperar el sobrenadante.

Cuantificación del ácido ascórbico.

Se prepara la solución problema utilizando alícuotas de 20, 30, 40 y 50 μL de sobrenadante a las que se les agregan 180, 170, 160 y 150 μL de agua destilada, respectivamente y se agrega 20 μL del reactivo Folin-Ciocalteu a todas las preparaciones, agitando hasta homogenizar. Para preparar una solución stock de ácido ascórbico se disuelven 1 mg de éste en 10 mL de agua, para posteriormente construir la curva patrón referida en el cuadro 7.

Cuadro 7. Curva patrón para la cuantificación de ácido ascórbico con reactivo de Folin-Ciocalteu

Tubo	Ácido ascórbico ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Ácido ascórbico stock μL	Agua (μL)	Folin Ciocalteu (μL)
1	0	0	1000	100
2	5	50	950	100
3	10	100	900	100
4	20	200	800	100
5	30	300	700	100
6	40	400	600	100
7	50	500	500	100
8	60	600	400	100
9	70	700	300	100

Una vez dispuestos los tubos de acuerdo con la curva, se leen a 760 nm en el espectrofotómetro. Con los datos de absorbancia que se obtenga, se realiza una interpolación para obtener la concentración de ácido ascórbico en la muestra.

(Jagota y Dani, 1982)

Apéndice VI. Método para la determinación de fenoles totales

Para la muestra problema se pesan 300 mg de miel y se disuelve en 500 μL de agua destilada y se afora a 1 mL en una probeta.

Se construye una curva patrón usando ácido gálico como solución estándar con una concentración de 0.2 mg/mL de la cual se toman alícuotas seriadas de acuerdo con el cuadro 8, a las cuales se les agrega el volumen correspondiente de agua para obtener un volumen de 1 mL.

Posteriormente se les agregan 700 μL a cada tubo, incluyendo el del problema y se mezclan. A continuación, se adicionan 50 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Después de cinco minutos, se añaden 150 μL de una solución de Na_2CO_3 (200 g/L) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Curva patrón para la determinación de fenoles totales.

Tubo	Ácido gálico (mg/mL)	Patrón ácido gálico (μL)	Agua destilada (μL)	Agua destilada (μL)	Reactivo de Folin-Ciocalteu (μL)	Na_2CO_3 (μL)
Blanco	--	--	--	700	50	150
1	0.00625	3.12	96.88	700	50	150
2	0.0125	6.25	93.75	700	50	150
3	0.0250	12.5	87.5	700	50	150
4	0.05	25.0	75.0	700	50	150
5	0.1	50.0	50.0	700	50	150
6	0.2	100.0	0	700	50	150
Problema	--	25.0	75.0	700	50	150
Problema	--	50.0	50.0	700	50	150
Problema	--	100.0	0	700	50	150

Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente, se mide la absorbancia a 760 nm. (Método modificado de Singleton et al., 1999)

Apéndice VII. Determinación de flavonoides totales.

Los flavonoides pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos, poseen varios grupos hidroxilos enlazados a estructuras anulares, C₆-C₃-C₆, designadas como anillos A, B y C. Dependiendo del grado de oxidación, pueden dividirse en flavonas, flavonoles, flavononas, isoflavonas, flavanos, y antocianinas (Cianciosi et al., 2018).

El contenido de flavonoides totales se determina usando una curva patrón de quercetina (0-100 µg/L) de acuerdo con el cuadro 9.

Preparación de la solución STOCK 1

0.003 g de quercetina + 3mL de MeOH

Preparación de la solución STOCK 2

Del stock 1 de quercetina, tomar 20 µL que llevarán 20 µg, después, agregar 180 µL de MeOH para conseguir un volumen final de 200 µL.

Para las concentraciones 1 a 5 ppm, hacer lo siguiente:

Del STOCK 2 tomar los volúmenes indicados solo para las concentraciones 1 a 4 ppm.

Los volúmenes indicados de STOCK para las concentraciones 5 a 100 ppm se tomarán de la primera solución STOCK.

Cuadro 9. Curva patrón para la cuantificación de flavonoides totales.

[] ppm	µL STOCK	µL MeOH	(AlCl ₃) al 2% mL
1	10	990	1
2	20	980	1
3	30	970	1
4	40	960	1
5	5	995	1
6	6	994	1
7	7	993	1
8	8	992	1
9	9	991	1

10	10	990	1
20	20	980	1
30	30	970	1
40	40	960	1
50	50	950	1
60	60	940	1
70	70	930	1
80	80	920	1
90	90	910	1
100	100	900	1
Problema	1 mL	0	1

Preparación del blanco para la muestra

600 mg de la muestra en solución con 3 mL de metanol sin (AlCl₃).

En el caso de la miel se recomienda sustituir el metanol por agua destilada, pues con el solvente se forma un precipitado al momento de hacer la disolución.

Preparación del problema

Tomar 1 mL del blanco y agregar 1 mL de AlCl₃.

Lectura

Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente. Se determina la absorbancia a 450 nm.

Los resultados se expresan como equivalentes de quercetina/g de muestra (eqQ/g)

(Ramamoorthy y Bono, 2007)

Apéndice VIII. Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el método de reducción del radical DPPH

Pesar 10 mg de miel y diluir en 5 mL de agua destilada para preparar la solución STOCK. Posteriormente se toman 20 μ L de la primera preparación y se le agregan 180 μ L de MeOH, formando así el STOCK 2. Después se realiza un gradiente de concentraciones para ver si existe una relación entre la concentración y la actividad antioxidante, de acuerdo con el cuadro 10.

Para las concentraciones:

Del STOCK 2 tomar los volúmenes indicados solo para las concentraciones 1 a 4 ppm. Los volúmenes indicados de STOCK para las concentraciones 5 a 500 ppm se tomarán de la primera solución STOCK.

Cuadro 10. Concentraciones estándar para determinar la actividad antioxidante de una muestra de miel mediante la reducción del radical DPPH.

[ppm]	μL STOCK	μL Agua destilada
2	10	990
4	20	980
6	30	970
8	40	960
10	5	995
12	6	994
14	7	993
16	8	992
18	9	991
20	10	990
40	20	980
60	30	970
80	40	960
100	50	950
120	60	940

140	70	930
160	80	920
180	90	910
200	100	900
300	150	850
400	200	800
500	250	750
600	300	700
800	400	600
1000	500	500

En una placa de ELISA se colocan por triplicado 50 µL de cada concentración, posteriormente, se añade 150 µL de la solución metanólica de DPPH. Se protege inmediatamente de la luz y se incuba por 30 minutos a una temperatura de 37°C. Posteriormente se mide la absorbancia de las reacciones a 540 nm en un lector de ELISA SLT Spectra. El blanco consistió en 200 µL de MeOH y DPPH.

Cálculo del porcentaje de reducción

Los resultados se reportan en porcentaje de reducción y se calculan con la siguiente fórmula:

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

En donde:

C= Absorbancia del DPPH

E= Absorbancia del experimento (Mezcla de DPPH+miel)

Cálculo de la capacidad antioxidante (CA₅₀)

Se gráfica la concentración contra el porcentaje de reducción para después hacer una regresión lineal con la que se obtiene la ecuación de la gráfica que será despejada para obtener la concentración de la muestra necesaria para reducir al DPPH en un 50%.

(Okusa et al., 2007).

Apéndice IX. Método de difusión en agar Kirby-Baüer.

Se utiliza caldo Müeller-Hinton como medio de cultivo.

Con un asa de siembra estéril se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias del microorganismo a ensayar, se sumerge y se enjuaga el material en 10 mL de caldo Müeller-Hinton. El tubo con el caldo inoculado se incuba a 37°C durante 24 horas.

Posteriormente se inocula la superficie de una placa de agar, sembrando mediante estría por lo menos en tres direcciones, girando la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría.

Una vez seco el inóculo, se procede a colocar la muestra a la que se le evaluará la actividad antimicrobiana y finalizado el procedimiento, se incuban las cajas durante 24 horas a 35 °C.

Aplicación de la miel

Con la boquilla de una pipeta Pasteur se hacen perforaciones en el agar, buscando abarcar toda la profundidad de la placa. Cada pozo realizado en la placa se llena en su totalidad con la muestra de miel.

Finalmente, la sensibilidad de las bacterias se evalúa utilizando sensidiscos impregnados con 25 µg de Cloranfenicol.

Referencias bibliográficas

- Aguirre, P. (2019). Alimentos funcionales entre las nuevas y viejas corporalidades. *AIBR: Revista de Antropología Iberoamericana*, 14(1), 95-120.
- Alatríste-Pérez, I., Rivera-Arredondo, V., Rodríguez-Alcalá, O. y Zarate-Castillo, G. (2017). Evaluación de características fisicoquímicas y reológicas de miel comercializada en municipios de la zona centro del Estado de Veracruz. *Revista de Simulación y Laboratorio*, 4(12), 6-11.
- Alvarado-Ávila, L., Moguel-Ordoñez, Y., García-Figueroa, C., Ramírez-Ramírez, F., y Arechavaleta-Velasco, M. (2022). Presencia de alcaloides pirrolizidínicos en miel y los efectos de su consumo en humanos y abejas. revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 13(3), 787-802. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v13i3.6004>
- Álvarez-Suárez, J., Tulipani, S., Díaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., Damiani, E., Astolfi, P., Bompadre, S. y 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.
- Atrouse, O., Oran, S. y Al-Abadi, S. (2004). Chemical analysis and identification of pollen grains from different Jordanian honey samples. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 413–417.
- Becerra, D. J., Cabrera, J. C. y Solano, M. (2016). Efecto antibacteriano de la miel de abeja en diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus*. *Revista Científica Ciencia Médica*, 19(2), 38-42.
- Biruete, A., Juárez, E., Sieiro, E., Roero, R. y Silencio, J. L. (2009). Los nutraceuticos. Lo que es conveniente saber. *Revista Mexicana de Pediatría*, 76(3), 136-145.
- Castillo-Martínez, T., García-Osorio, C., García-Muñiz, J. G., Aguilar-Ávila, J., & Ramírez-Valverde, R. (2022). Azúcares y °Brix en miel de *Apis mellifera*, *Melipona beecheii* y miel comercial del mercado local en México. *Veterinaria México OA*, 9. <https://doi.org/10.22201/fmvz.24486760e.2022.950>

- Caycedo, L. Corrales, L. C. y Trujillo, D. M. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, 19(36). <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>
- Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T. Y., Afrin, S., Gasparri, M., Reboredo-Rodríguez, P., Manna, P. P., Zhang, J., Bravo, L., Martínez, S., Agudo, P., Quiles, J., Giampieri, F. y Battino, M. (2018). Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: a review. *Molecules*, 23(9), 2322. <https://doi.org/10.3390/molecules23092322>
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2020). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute
- Contreras-Martínez, C. S., Macías-Nieves, J. P., García-González, J. M., Trejo-Guardado, V. I., & Carranza-Concha, J. (2020). Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Bee Honey Produced in Zacatecas, Mexico. *Revista Fitotecnia Mexicana*. <https://doi.org/10.35196/rfm.2020.4.453>
- Grajales-Conesa, J., Velázquez-Aguilar, J. M., Rincón-Rabanales, M. y Sánchez-Guillén, D. (2013). Caracterización físico-química de mieles de *Apis mellifera* de tres paisajes forestales de Chiapas. *Quehacer Científico en Chiapas*, 8(2).
- Dávila, M., Rojas, L., Navarro, A., Ángel, M. y Regalado, P. (2020). Determinación de la calidad fisicoquímica de la miel de abeja *Apis mellifera mellifera* producida en el Municipio de Tepatlaxco, Ver., envasada en vidrio y PET apoyado en un estudio etnobiológico. *Revista Científica Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 8(2). <https://doi.org/10.47808/revistabioagro.v8i2.179>
- Dobrin, S., Soceanu, A., Birghila, S., Birghila, C., Matei, N., Popescu, V. y Constanda, L. (2022). Chemical Analysis and Quality Assessment of Honey Obtained from Different Sources. *Processes*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/pr10122554>
- Estrada, H., Gamboa, M., Chávez, C. y Arias, M. L. (2005). Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. Evaluación de su carga microbiana. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 55(2), 2-7.

- García, A. y Vázquez, D. (1998). Cuantificación de proteínas: una revisión. *BioTecnología*, 3, 77-88.
- García-Chaviano, M., Armenteros-Rodríguez, E., Escobar-Álvarez, M., García-Chaviano, J., Méndez-Martínez, J. y Ramos-Castro, G. (2022). Composición química de la miel de abeja y su relación con los beneficios a la salud. *Revista médica electrónica*, 44(1).
- Gheldof, N., Wang, X. y Engeseth, N. (2002). Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources. *J. Agric. Food Chem.*, 50(21), 5870–5877.
- González, M., Peñalosa, C., 2000. Biomoléculas (Métodos de análisis). Edo. De Méx: Universidad Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
- Hernández-Fuentes, A. D., Chávez-Borges, D., Cenobio-Galindo, A., Zepeda-Velázquez, A. P., Figueira, A. C., Jiménez-Alvarado, R., y Campos-Montiel, R. G. (2021). Characterization of total phenol and flavonoid contents, colour, functional properties from honey samples with different floral origins. *International Journal of Food Studies*, 10(2), 346-358. <https://doi.org/10.7455/ijfs/10.2.2021.a6>
- Izquierdo, A., Armenteros, M., Lances, L. y Martín, I. (2004). Alimentación saludable. *Revista Cubana de Enfermería*, 20(1).
- Jagota, S. K. y Dani, H. M. (1982). A new Colorimetric Technique for the Estimation of Vitamin C Using Folin Phenol Reagent. *Analytical Biochemistry*, 127(1), 178-182.
- Lobos, I. y Pavez, P. (2021). Apicultura en el Territorio Patagonia Verde, Región de Los Lagos. Boletín INIA N° 442, 146 p. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro Regional de Investigaciones Remehue, Chile.
- López, T. (2002). Flavonoides. *Offarm*, 21(4).
- Marcelo, H. y Analía, T. (2007). Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 41(4).
- Martín, D. (2018). Los compuestos fenólicos, un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1), 81-104. <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>
- Mato, I. (2004). Estudio de los ácidos orgánicos no aromáticos en la miel. Universidad de Santiago de Compostela.

- Mondragón-Cortez, P., Ulloa, J.A., Rosas-Ulloa, P., Rodríguez-Rodríguez, R. y Reséndiz, J. (2013). Physicochemical characterization of honey from the West region of México. *CyTA - Journal of Food*, 11(1), 7-13. DOI: [10.1080/19476337.2012.673175](https://doi.org/10.1080/19476337.2012.673175)
- Moniruzzaman, M., Chua, Y., Rao, P. V., Hawlader, M., Azlan, S., 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*, 2014, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2014/737490>
- National Honey Board. 2005. Honey: A Reference Guide to Nature's Sweetener. Firestone, CO.
- Norma Oficial Mexicana NOM-004-SAG/GAN-2018, Producción De Miel y Especificaciones. Recuperado de https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5592435&fecha=29/04/2020#gs.c.tab=0
- Okusa, P., Penge, O., Devleeschouwer, M. y Duez, P. (2007). Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii*. *J. Ethnopharmacol*, 112, 476-481. DOI: [10.1016/j.jep.2007.04.003](https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.04.003)
- Prescott, L., Harley, J. y Klein, D. (2004). Microbiología. Madrid : McGraw-Hill Interamericana de España.
- Ramos, A. y Pacheco, N. (2016). Producción y comercialización de miel y sus derivados en México: Desafíos y oportunidades para la exportación. México: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.
- Ramamoorthy, P. y 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.
- Ranneh, Y., Akim, A., Hamid, H., Khazaai, H., Fadel, A., Zakaria, Z., Albuja, M. y Abu, M. (2021). Honey and its nutritional and anti-inflammatory value. *BMC Complement Med Ther* 21, (30). <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03170-5>
- Reyes-Salas, E., Gazcón-Orta, N., Manzanilla-Cano, J., Reyes-Salas, A., Camou, A., Reyes-González, A. y Caballero-Puente, H. (2014). Electrochemical Evaluation of

Quality Characteristics in Honey from Meliponini And Apis mellifera Bees. *Annals. Food Science and Technology*, 15(1).

- Rodríguez, A. J., Pérez, E. M. y Vit, P. (2007). Capacidad antioxidante de mieles venezolanas de los géneros *Apis*, *Melipona* y *Tetragonisca*, evaluada por tres métodos. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 38(2).
- Salamanca, G. y Osorio, M. (2016). Determinación de la Actividad Óptica en Mieles -Rotación específica-. *LIPFA*. DOI:10.13140/RG.2.2.34574.46409
- Sakika, K. A., Saiman, M. Z., Zamakshshari, N. H., Ahmed, I. A., Nasharuddin, M., & Hashim, N. M. (2022). Analysis of antioxidant properties and volatile compounds of honey from different botanical and geographical origins. *Sains Malaysiana*, 51(4), 1111-1121. <https://doi.org/10.17576/jsm-2022-5104-13>
- Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R. y Verdian-rizi, M. (2008). Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai Journal Pharmacology Science*, 32, 17-20.
- Singleton, V., Orthofer, R. y Lamuela-Reventós, R. (1999). Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymol.* 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Tapia-Campos, E., Castañeda-Saucedo, M. C., Ramírez-Anaya, J., Macías-Macías, J. O., Barajas-Pérez, J. S., Tapia-González, J. M., y Alaniz-Gutierrez, L. (2017). Physical-Chemical Characterization, Phenolic Content and Consumer Preferences of *Apis Mellífera* Honey in Southern Jalisco, México. *Interciencia*, 42(9), 603-609. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/339/33952909009.pdf>
- Tauguinas, A., Avallone, C., Hoyos, S. y Cravsov, A. (2005). Análisis de niveles de concentración de vitamina C en mieles de la provincia del Chaco. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*.
- Ulloa, J. A., Mondragón, P. M., Rodríguez, R., Reséndiz, J. A. y Rosas, P. (2010). La miel de abejas y su importancia. *Revista Fuente*, 4(2), 11-18.
- Valadez, R., Blanco, A., Pérez, G. y Rodríguez, B. (2004). Retomando la Apicultura del México antiguo. *Imagen Veterinaria*, 4(2), 4-15.
- Vanden, D. y Vlietnick, A. (1991). Screening methods for antibacterial agents from higher plants. *Methods in plant biochemistry* (6), 47-71.

- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Zaldívar-Cruz, J. M., Kuri, V., Fernández-López, J., Carbonell-Barrachina, A. A. y Pérez, J. A. (2010). Aroma profile and physico-chemical properties of artisanal honey from Tabasco, Mexico. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(6), 1111-1118.
- Zago, K., María y García, F., Di Bernardo, M., Vit, P., Luna, J. y Gualtieri, M. (2010). Determinación del contenido de vitamina C en miel de abejas venezolanas por volumetría de óxido-reducción. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 41(1).
- Zamora, L. y Arias, M. (2011). Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón. *Revista Biomédica*, 22(2), 59-66.
- Zavala-Olalde, A., Colomo-González, I., Matalí-Pérez, N., Piana, L., Olivier, B., Méndez-Villareal, A. y Vandame, R. (2013). Characterization of four typical honeys from highly diverse tropical ecosystems. *Journal of Apicultural Research*, 52(2), pp. 24–34.