



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**“Estudio comparativo de las propiedades
nutracéuticas de tres mieles de *Apis mellifera* de
diferentes localidades de México”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA:

ARREDONDO FERNÁNDEZ RODRIGO

DIRECTORA:

DRA. MA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO.

2017





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.

Reconocimiento

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Farmacognosia ubicado en la Unidad de Biotecnología y Prototipos, perteneciente a la División de Investigación y Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, dirigido por la Dra. Ma. Margarita Canales Martínez y financiado por el proyecto **PAPIIT-UNAM IN212317**.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y a la carrera de Biología

A mi asesora de tesis, la Dra. Ma. Margarita Canales Martínez, por el apoyo y la oportunidad de trabajar en su equipo de investigación.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy y a los integrantes del laboratorio de Inmunología por la asesoría brindada.

A los compañeros del laboratorio de Farmacognosia por integrarme al equipo y estar siempre en la disposición de ayudar cuando las dudas surgían.

“No necesitamos magia para cambiar el mundo, llevamos todo el poder que necesitamos dentro de nosotros”

-J.K. Rowling

“Quien hace una pregunta debe ser capaz de soportar la respuesta”

— George R. R. Martin

“No desprecies las tradiciones que nos llegan de antaño; ocurre a menudo que las viejas guardan en la memoria cosas que los sabios de otro tiempo necesitaban saber”

— J. R. R. Tolkien

Dedicatorias

A mi madre, Imelda Fernández Flores, este trabajo es la evidencia de que alcanzamos una meta juntos. Con tu apoyo, educación y cariño se logró que llegáramos hasta aquí. Como has dicho, estabas ahí para fortalecer mis alas y ahora toca emprender el vuelo. Te amo.

A mi hermano, Yahir Arredondo Fernández, espero seguir siendo tu mejor ejemplo. El saber que me sigues, me motiva a ser un el mejor profesional y un mejor individuo. A pesar de nuestras evidentes diferencias, te amo hermanito.

A mi padre, Urbano Arredondo Rodríguez, sin duda tu apoyo fue importante, muchas cosas habrían sido difíciles sin ti. Gracias por enseñarme el valor de la responsabilidad y el sacrificio.

A mis amigos, casi hermanos, Hídali Montiel y Eduardo Torres, por su incondicional apoyo después de tantos años y aventuras. Ustedes son el ejemplo de una verdadera amistad. Les deseo el mejor futuro profesional y personal. Los quiero mucho.

A Cecilia S. Castillo Chávez, gracias por acompañarme en esta aventura. Eres una persona importante para mí y agradezco tu presencia en mi vida. Gracias por el cariño y apoyo que me has dado a pesar de las dificultades. Eres una mujer fuerte e independiente, digna de admiración. Te deseo lo mejor y ten en cuenta que estaré ahí cuando lo necesites. Te quiero inconmensurablemente.

A Uriel, gracias por ser mi mejor amigo cuando lo necesité. Te agradezco la sapiencia que me guió en mis momentos de flaqueza y tu paciencia para escuchar mis conflictos. Gracias infinitas. Sabes que puedes contar conmigo. Te quiero amigo.

A los amigos de la carrera, Christian, Natalie, José, Linet, Toño, Pao, y al resto del grupo 01, les agradezco el apoyo, amistad y convivencias de las que me hicieron parte. Gracias por todos esos semestres de aventuras, desvelos y logros alcanzados juntos.

A Mizraim, es gracioso como la vida funciona, agradezco que aparecieras cuando la vida se volvió solitaria. Gracias por recordarme la importancia de mantener la confianza en mi persona. Te deseo mucho éxito en tu futuro profesional, espero ser testigo de tus triunfos, así como tú lo seas de los míos. Te quiero mucho.

Índice general

Índice de figuras	i
Índice de cuadros	ii
Resumen.....	1
Introducción	3
Antecedentes	6
Hipótesis.....	9
Objetivo general	9
Materiales y métodos.....	10
Resultados y análisis.....	17
Discusión.....	26
Conclusiones	36
Apéndice I. La miel	37
Apéndice II. Resistencia a los fármacos antimicrobianos.....	40
Apéndice III. Parámetros de calidad de la miel, estudio organoléptico.....	41
Apéndice IV. Cuantificación de Ácidos Orgánicos	43
Apéndice V. Determinación de carbohidratos por el método de Nelson-Somogyi.....	44
Apéndice VI. Cromatografía líquida de alta resolución para carbohidratos (HPLC).....	46

Apéndice VII. Cuantificación de vitamina C (ácido ascórbico) con reactivo de Folin-Ciocalteu.....	47
Apéndice VIII. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	49
Apéndice IX. Determinación permanganométrica de peróxido de hidrógeno	51
Apéndice X Determinación de la presencia de ácido cafeico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	52
Apéndice XI. Método para la determinación de fenoles totales.....	53
Apéndice XII. Determinación de flavonoides totales.....	55
Apéndice XIII. Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el método de reducción del radical DPPH	57
Apéndice XIV. Método de difusión en agar.....	59
Referencias bibliográficas	61
Sitios web	64

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de la ubicación del municipio de San Jerónimo Tecoátl en el estado de Oaxaca	10
Figura 2. Mapa de la ubicación del municipio de Texcoco en el Estado de México	11
Figura 3. Mapa de la ubicación del municipio de Tenosique en el Estado de Tabasco	12
Figura 4 Actividad antimicrobiana de las tres muestras de miel.....	23

Índice de cuadros

Cuadro 1. Caracterización sensorial organoléptica de las muestras de miel.	17
Cuadro 2 Características físicas de las muestras de miel.	17
Cuadro 3. Efectos de las muestras de miel sobre el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	21
Cuadro 4. Efecto inhibitorio de las muestras de miel en hongos filamentosos.....	24
Cuadro 5. Efecto inhibitorio de las muestras de miel sobre hongos levaduriformes	25
Cuadro 6. Composición general de la miel.....	37
Cuadro 7 Especificaciones fisicoquímicas de la miel.....	41
Cuadro 8 Curva patrón para la cuantificación de carbohidratos por el método de Nelson-Somogyi.....	44
Cuadro 9 Curva patrón para la cuantificación de ácido ascórbico con reactivo de Folin-Ciocalteu	47
Cuadro 10. Curva patrón para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	49
Cuadro 11 Concentraciones para preparar curva patrón para la determinación de fenoles totales.	53
Cuadro 12. Curva patrón para la cuantificación de flavonoides totales.	55
Cuadro 13. Concentraciones estándar para determinar la actividad antioxidante de una muestra de miel mediante la reducción del radical DPPH	57

Resumen

El aprovechamiento de los recursos naturales ha permitido satisfacer necesidades básicas como la de la obtención de alimento y el mantenimiento de la salud, lo que ha permitido el desarrollo de las comunidades humanas. La miel de *Apis mellifera* es un recurso que desde la antigüedad se ha utilizado como un edulcorante natural del cual se conocen propiedades medicinales que dependen de las características de la flora circundante a los apiarios.

El objetivo de este trabajo fue comparar las propiedades nutraceuticas de tres muestras de miel de *Apis mellifera* provenientes de Oaxaca, Estado de México y Tabasco respectivamente. Para ello se realizó un análisis bromatológico donde se analizaron las propiedades físicas y organolépticas, se cuantificaron los carbohidratos, proteínas, ácido ascórbico y peróxido de hidrógeno, además, se midió la capacidad antioxidante, cuantificando la cantidad total de fenoles y flavonoides y la reducción de DPPH, además, se evaluó la actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Como resultados, se observó que, de los elementos cuantificados en el análisis bromatológico, la miel de Tabasco presentó los resultados más altos a excepción de la cuantificación de ácido ascórbico donde la miel de Oaxaca tuvo el contenido más alto. El alto contenido de fenoles y flavonoides de la miel de Tabasco se ve reflejado en una mejor actividad antioxidante a comparación de las otras dos muestras.

En cuanto a la actividad antimicrobiana, la miel del Estado de México y la de Tabasco, presentaron una actividad más significativa tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas. La miel del Estado de México fue mejor inhibiendo el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, *Staphylococcus. epidemidis* caso clínico y *Vibrio choleare* casi clínico; mientras que la miel de Tabasco tuvo

mejor actividad inhibiendo a *Pantoea agglomerans* CDBB-B-959, *Staphylococcus aureus* 85S Met. Resistente y *Proteus mirabilis* caso clínico.

En conclusión, se puede observar que las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las mieles cambian de acuerdo a la zona de origen, pero mantienen ciertas características, como la humedad, y el contenido de peróxido de hidrógeno; que concuerdan con las normativas de calidad. En ese sentido, las tres mieles se pueden considerar como alimentos nutraceuticos, de las cuales, la miel de Tabasco fue la que tuvo mejor actividad antioxidante, mientras que, en la actividad antimicrobiana, la miel del Estado de México y la de Tabasco fueron las más efectivas.

Introducción

El aprovechamiento de los recursos naturales ha permitido a la humanidad desarrollarse ampliamente, pues la riqueza biológica actúa como la principal fuente de alimentos, medicinas y otros productos, permitiendo así, cubrir necesidades de nutrición, salud y refugio (Starr et al., 2009). Enfatizando, la nutrición consiste en la ingesta de alimentos que contienen sustancias indispensables como carbohidratos, proteínas, minerales y vitaminas, para el correcto desarrollo físico y mental, prevenir enfermedades y obtener energía, viéndose reflejada en un buen estado de salud (OMS, 2016; FAO, 2016).

Es por ello que la desnutrición sigue siendo un problema mundial, pues se estiman 796 millones de personas subalimentadas. Sin embargo, México está considerado dentro de los países que han logrado reducir la población subalimentada por debajo del 5%, pero aún faltan acciones para erradicar el hambre y mantener una población sana (FAO, FIDA y PMA, 2015).

Una alternativa para satisfacer las necesidades nutrimentales y de salud es el consumo de alimentos considerados nutraceuticos, los cuales, además de proveer nutrientes como carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales; tienen propiedades medicinales que son concedidas gracias a sustancias antioxidantes, vitamina C y vitamina E, compuestos fenólicos, probióticos y nutrientes inorgánicos como el hierro, calcio o ácido fólico (Birute-Guzmán et al., 2009). El término fue acuñado por Stephen DeFelice, fundador y presidente de la Fundación por la Innovación en la Medicina (FIM, por sus siglas en inglés) en 1989, quien define a los nutraceuticos como alimentos que proveen beneficios a la salud, que incluye la prevención o tratamiento a enfermedades (Kalra, 2003).

La miel es uno de los alimentos más antiguos de los que se tiene registro histórico, pues la evidencia arqueológica indica que ha sido utilizada como alimento desde el período Mesolítico, eso es, 7000 años a.C.; además, una tablilla Sumeriana

fecha entre los años 2100-2000 a.C., menciona los usos medicinales y nutricionales de la miel; otra evidencia histórica es que en la Grecia antigua, Aristóteles recomendaba el uso de la miel para tratar heridas, y Dioscórides, 50 años d.C., la indicaba para curar úlceras infectadas. Actualmente, la miel sigue utilizándose en la medicina tradicional como un agente terapéutico para tratar úlceras infectadas, dolores de garganta, como tratamiento tópico de rubeola y sarampión, entre otros (Ulloa et al., 2010).

La definición oficial de la miel de acuerdo al Codex Norma para la miel (Codex stan 12-1981 rev. 2001) es:

“Se entiende por miel la sustancia dulce natural producida por abejas Apis mellifera a partir del néctar de las plantas o de las secreciones de partes vivas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas y que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, y depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure y añeje”.

Las características de la miel dependen del lugar de donde las abejas recolecten el néctar, aunque generalmente se compone en tres principales, los azúcares glucosa y fructuosa, y agua; aunque en menor proporción, elementos como minerales y vitaminas, están comúnmente presentes (PROFECO, 2001).

Aunque México está posicionado en el tercer lugar a nivel mundial como exportador de miel, ya que la producción anual estimada es de 55 mil 900 toneladas, los estados que más miel producen son Yucatán, Campeche, Jalisco, Chiapas y Veracruz, actualmente hay una problemática que ha reducido dramáticamente la producción de miel a nivel nacional, atribuido al uso de agroquímicos para combatir plagas en cultivos, al cambio climático y a la malnutrición de los enjambres, provocando que las exportaciones se reduzcan hasta un 52 % en 2015, siendo los apicultores rurales los más afectados (Pérez, 2016).

Como se ha mencionado antes, la miel se ha utilizado para combatir infecciones y su actividad antibacterial se conoce desde el siglo XIX, propiedad atribuida a las altas concentraciones de azúcar y a la baja humedad, lo que crea estrés osmótico inhibiendo el crecimiento de microorganismos; la presencia de peróxido de hidrógeno, un agente oxidante ayuda a prevenir la presencia de patógenos en las etapas tempranas de la producción de la miel; metilglioxal y recientemente, se ha descubierto un péptido antimicrobiano denominado Bee defensin-1, que ha probado ser efectivo contra bacterias Gram positivas, aunque hasta ahora, sólo ha sido encontrado en la jalea real, en la miel de Manuka (*Leptospermum scoparium*), una especie nativa de Australia y Nueva Zelanda, y la miel *Revamil*® una miel comercial de grado médico; por lo que falta investigar su presencia en otras mieles, ya que este péptido es producido en las glándulas hipofaríngeas de las abejas durante la producción de la miel (Kwakman y Zaat, 2012).

La miel, al contar con actividad antimicrobiana, actúa como una alternativa al uso de antibióticos, lo que es importante, ya que el fenómeno de la farmacorresistencia desarrollada por patógenos microbianos como bacterias, hongos, virus y algunos parásitos, hace que los tratamientos alopáticos para las infecciones dejen de funcionar, lo que implica una amenaza a la salud pública a nivel mundial. Se han emitido propuestas para contrarrestar la resistencia a los antibióticos, que están enfocadas en la prevención de las infecciones, como mejorar las condiciones de higiene y el acceso al agua potable, con la intención de reducir la necesidad de tales fármacos; y el desarrollo de nuevos productos antibióticos (OMS, 2014). En tal escenario, la promoción del consumo de la miel es oportuna, pues funcionaría como un agente preventivo de infecciones.

El propósito de este trabajo es enriquecer el conocimiento de las propiedades de la miel, sobre todo de la miel mexicana, pues, además de ser un producto de importancia nutrimental y económica, ha sido parte de la medicina tradicional, razón

suficiente para sugerir que es una alternativa factible para la prevención de enfermedades infecciosas y otros padecimientos. Es importante resaltar las bondades que el consumo de la miel provee a la salud y así, incentivar a mejorar la apicultura nacional, un fuerte representante de la miel a nivel mundial, y una fuente importante de ingresos, que ahora se encuentra en peligro por el uso indiscriminado de agroquímicos que afectan la producción a niveles críticos.

Antecedentes

Cooper et al., (1999), probaron la actividad antimicrobiana de dos mieles de Nueva Zelanda, una miel de flor de Manuka y una pasta de miel proveniente de pasturas, en cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de heridas infectadas, encontrando que las propiedades antimicrobianas se deben no sólo a la alta osmolaridad y al contenido de peróxido de hidrógeno, sino también a compuestos fitoquímicos no identificados.

Viuda-Martos et al., (2010), elaboraron un perfil aromático y evaluaron las propiedades fisicoquímicas de diez muestras de miel, provenientes de pequeños productores y colectadas en dos estaciones y ecosistemas agrícolas diferentes de Tabasco, encontrando que pertenecen al grupo de las mieles oscuras; que la fructuosa (39.45%) es el azúcar principal, seguida de la glucosa (35.74%); la humedad se encuentra en un rango que comprende desde el 18 al 24.30% de la composición total; el color de las muestras las ubica dentro de la categoría de las mieles oscuras; el pH se encontró en un rango del 3.25 al 3.97; el perfil aromático mostró que hay altos contenidos de compuestos relacionados con los bencenos y los furanos.

Ruíz-Navajas et al., (2011), evaluaron la actividad antioxidante de once muestras de miel artesanal de Tabasco, a través de la cuantificación total de los compuestos fenólicos y de flavonoides, encontrando un rango de 51 a 134 mg de equivalentes de ácido gálico/100g de miel y 29.6 a 187.1 mg/100 g,

respectivamente. La inhibición del radical DPPH fue similar entre las soluciones acuosas y metanólicas, quedando en un rango del 33 al 85%. La alta variación entre las propiedades antioxidantes de las muestras de miel, es atribuida a las variaciones de biodiversidad y de temporadas, lo que les da una naturaleza única.

Kwakman y Zaat., (2012) realizaron una revisión crítica de los componentes antibacterianos de la miel, donde, además de mencionar la alta osmolaridad y el contenido de peróxido de hidrógeno, incluye al metilglioxal ($\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{CHO}$), compuesto formado por azúcares a partir de la conversión de la dihidroxiacetona (DHA), con propiedades inhibitorias contra *S. aureus*; un péptido recién identificado como Bee defensin-1, una defensina, que ha probado tener una potente actividad contra bacterias Gram positivas, tal péptido pertenece al grupo de los péptidos antimicrobianos que forman parte del sistema inmune innato de invertebrados, que para este caso es producido en las glándulas hipofaríngeas de *Apis mellifera*; además de otros compuestos fitoquímicos como fenoles, que actúan en conjunto con los demás compuestos.

Rodríguez et al., (2012), evaluaron los parámetros de calidad y las propiedades antioxidantes y antibacterianas de 14 muestras de mieles mexicanas, encontrando que las mieles monoflorales de eucalipto y naranja tienen la mayor cantidad de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, además de tener una mejor actividad inhibitoria del crecimiento de los cuatro microorganismos probados, *Bacillus cereus* ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* Scott A., *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Las mieles mexicanas probadas resultaron ser buenas fuentes de antioxidantes y de compuestos antimicrobianos, por lo que los autores concluyen que las mieles mexicanas tienen propiedades que ayudan a mantener una buena salud.

Córdova-Córdova et al., (2013), llevaron a cabo una caracterización botánica de 12 muestras de miel de abeja (*Apis mellifera*) provenientes de 3 regiones de Tabasco, encontrando que en el estado pueden encontrarse una predominancia de

mieles multiflorales de las cuales se identificaron por técnicas mesopolínicas, un total de 63 especies pertenecientes a 32 familias botánicas, de las cuales, siendo de importancia mellífera, *Spondias mombin* de la familia Anacardiaceae, *Cocos nucifera* de la familia Arecaceae, *Bursera simaruba* de la familia Burseraceae, entre otras especies pertenecientes a las familias Cannabaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Tiliaceae, Piperaceae, Rutaceae y Urticaceae.; que forman parte de la flora apícola en regiones tropicales como Tabasco. Esto resalta la gran diversidad floral que posee el estado.

Libonatti et al., (2014), llevaron a cabo una revisión sobre la actividad antimicrobiana de diferentes mieles provenientes de diferentes partes del mundo, siendo el efecto inhibitorio contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, algo común entre las mieles reportadas, especialmente contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Bacillus subtilis*, por el método de difusión en agar. Este efecto está principalmente atribuido al peróxido de hidrógeno, sustancia que comparten las mieles estudiadas, aunque también reconocen la presencia de otros compuestos diferentes que recomiendan continuar investigando.

Justificación

La miel es un alimento nutritivo, pero indagar en las propiedades medicinales, en especial las antimicrobianas, brindaría más elementos para contrarrestar infecciones de una manera económicamente accesible sin agravar la situación de la farmacorresistencia que han desarrollado algunos patógenos microbianos.

Problema

¿Cuáles son las propiedades nutraceuticas particulares de cada una de las muestras de mieles?

Hipótesis

De acuerdo a la literatura donde se reporta que las propiedades fisicoquímicas más comunes de la miel, como la alta osmolaridad, el contenido de peróxido de hidrógeno, bajo pH y sustancias como fenoles y flavonoides, así como otras de naturaleza peptídica; le confieren a ésta propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram positivas y negativas. Estas propiedades de la miel son dependientes de la naturaleza de la flora circundante a los apiarios, por lo que cada miel tiene propiedades particulares de acuerdo a la región de origen.

Objetivo general

Evaluar las propiedades nutraceuticas con énfasis en la actividad antimicrobiana de tres mieles de *Apis mellifera* provenientes de tres localidades diferentes.

Objetivos particulares para cada muestra de miel.

- *Obtención de las muestras de miel.*
- *Estudio bromatológico:*
 1. Determinar las propiedades físicas y organolépticas
 2. Cuantificar de los carbohidratos reductores, proteínas, ácido ascórbico y peróxido de hidrógeno.
- *Evaluación de la capacidad antioxidante;*
 3. Cuantificar fenoles y flavonoides totales.
 4. Evaluar de la capacidad antioxidante, por la reducción del radical DPPH.
- *Pruebas biológicas:*
 5. Evaluar de la actividad antimicrobiana por medio del método de difusión en agar.

6. Materiales y métodos

Obtención de las muestras de miel

La primera muestra de miel fue obtenida gracias a una donación de la Universidad de la Cañada y proviene del municipio de San Jerónimo Tecóatl en el estado de Oaxaca, que se encuentra a una distancia de 232 Km de la capital del estado, a una altura de 1840 msnm, con coordenadas 18°10' N y 96°55' O. Los municipios con los que colinda son: San Francisco Huehuetlán y San Pedro Ocopetatillo, al norte; Santa Cruz Acatepec y San Mateo Yoloxochitlán, al este; San Lucas Zoquiapan y San Martín Toxpalan, al sur; y con Santa María Teopoxco, al oeste. El municipio cuenta con una superficie total de 17.86 Km² (Figura 1).

De acuerdo al apicultor, la miel fue colectada en el mes de octubre de 2015, y la zona circundante al apiario se caracteriza por cafetales, además, la flora del municipio es variada, representada por flores como el alcatraz, margaritas, gladiolas; árboles como liquidámbar, fresno, encinos, y especies frutales como aguacate, naranja, higo, míspero y chirimoya; plantas medicinales como ruda, manzanilla, epazote, entre otras más.

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 San Jerónimo Tecóatl en el estado de Oaxaca (Tomada de: <http://www.inafed.gob.mx>)

La segunda muestra de miel fue obtenida en el apiario del Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas, ubicado en Montecillo, dentro de la región 3 del municipio de Texcoco, Estado de México. El municipio se encuentra geográficamente al este del estado, colindando al norte con los municipios de Tepetlaoxtoc, Papalotla, Chiautla y Chiconcuac; al oeste con Atenco; al sur, con Chimalhuacán, Chicoloapan e Ixtapaluca; y al este con los estados de Tlaxcala y Puebla; contando con las siguientes coordenadas: 19°33'41" N 99°01'45" O. El municipio tiene una extensión territorial de 432.61 Km² y se encuentra a una altura de 2250 msnm (Figura 2)

La colecta de la miel se llevó a cabo el mes de octubre de 2015, y de acuerdo al apicultor, la miel fue elaborada con la flora del periodo primaveral de la zona que rodea al apiario, la cual cuenta con una gran cantidad de árboles de pirul (*Schinus molle* L.), especie cuya floración ocurre en primavera; cultivos comestibles y árboles frutales como tejocote, capulín, chabacano, olivo, manzano, higo, entre otros más; así como cultivos de flores de ornamento como rosas, claveles, alcatraces, gladiolos, nube, margaritas, violetas, bugambilias, nardos, etc.

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 Texcoco en el Estado de México (Tomada de: <http://www.inafed.gob.mx>)

La tercera muestra de miel fue donada por un miembro del grupo apicultor productor de la misma, “La Frontera Sur”, ubicado en el ejido Estapilla, dentro del

municipio de Tenosique, Tabasco. La colecta de esta miel se llevó a cabo en el verano de 2016, y de acuerdo con el apicultor, se trata de una miel multifloral, proveniente de una zona donde abundan los arboles de cítricos.

La localización del municipio de Tenosique se encuentra en la Región de los Ríos, teniendo como cabecera municipal a la ciudad de Tenosique de Pino Suárez, ubicada al sur del estado, con coordenadas 17°28.5' N y 91°25.6' O; colinda al norte con el municipio Balancán, al sur con el estado de Chiapas y la república de Guatemala, al oeste con los municipios de Emiliano Zapata en Tabasco y Chilón en Chiapas y cuenta con una extensión de 1883.9 Km² (Figura 3).

Cuenta con áreas de selva media perennifolia, pero en general, la vegetación ha sufrido de tala intensiva a favor de la ganadería. Sin embargo, el municipio es reconocido por sus maderas preciosas y tintóreas, teniendo 5 Ha de superficie boscosa donde se encuentran especies como cedro rojo (*Cedrela odorata*), caoba (*Swietenia macrophylla*), ceiba (*Ceiba* sp.), macuilis (*Tabebuira rosea*), chicozapote (*Manilkara zapota*), entre otros.

Con el fin de simplificar la nomenclatura de las muestras, se designará esta miel como Miel 3



Figura 3. Mapa de la ubicación del municipio de Tenosique en el Estado de Tabasco (Tomada de: <http://www.inafed.gob.mx>)

Estudio bromatológico.

Se determinaron los parámetros de calidad: propiedades físicas y organolépticas de la muestra de miel (densidad, humedad, pH, color, sabor, aroma, consistencia), y se evaluaron las características sensoriales de acuerdo a las explicaciones de la Norma Mexicana de la miel (NMX-F-036-1997).

La densidad absoluta fue evaluada por la técnica convencional usando la fórmula:

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

El pH se midió con la ayuda de un potenciómetro marca HANNA modelo HI 98103 y la humedad se midió cuantificando los grados Brix con un refractómetro digital de mano para la humedad de la miel "Pocket" Pal 22-S de la marca ATAGO®.

Se utilizó un fotómetro para análisis el análisis del color de la miel marca HANNA, modelo 96785, que mide el color en función a los mm en la escala de Pfund, un parámetro estandarizado internacionalmente basado en la comparación óptica (Delmoro et al., 2010)

Cuantificación de ácidos orgánicos (González y Peñalosa, 2000)

Se realizó a través de titulación con NaOH, técnica basada en una reacción ácido-base o de neutralización. La solución problema se preparó disolviendo 1 g de miel en 10 mL de agua destilada con 5 gotas de fenolftaleína. La solución titulante, NaOH al 0.01M, contenida en una bureta de 10 mL, se agregó lentamente hasta que la solución problema tuvo un cambio de color que duró más de 1 minuto. Los mL de solución titulante fueron registrados para calcular el contenido de ácidos orgánicos (Apéndice IV).

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

Después de realizar una extracción de 10 mg de la muestra de miel con 1 mL de etanol al 80%, se cuantificó por el método de Nelson-Somogyi, procesando la muestra de acuerdo a la curva patrón de glucosa 200 µL/mL (Apéndice V).

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

A 100 mg de la muestra de miel, se agregó 900 μL de ácido tricloroacético al 10% y se procedió a homogeneizar durante 5 min, para después reposar en baño de hielo, y proceder a centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos.

Tomando 500 μL del sobrenadante, se agregó 4.3 mL de agua destilada y 200 μL del reactivo Folin-Ciocalteu. La concentración se determinó usando una curva patrón de la solución stock de ácido ascórbico (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y midiendo la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (Apéndice VII).

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

Se extrajeron las proteínas de 100 mg de muestra adicionando 2 mL de una mezcla de MeOH-cloroformo-agua (12:5:3), homogenizando en un baño de hielo. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos, varias veces hasta que se dejó de apreciar color, recuperando la fase acuosa cada vez, ya que ahí se encontraban las proteínas a cuantificar por el método de Bradford, utilizando una curva patrón de albumina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se leyó en placa ELISA a 595 nm (Apéndice VIII).

Determinación permanganométrica de peróxido de hidrógeno (Chang, 2007)

En esta técnica, la muestra problema se diluye y se titula en un medio ácido, usando como titulante permanganato de potasio, provocando una reacción neutralizante. Para ello, 2 mL de la muestra de miel, en una concentración de 100 mg/mL, deben aforarse a 3 mL, y agregar 3.5 mL de H_2SO_4 en una concentración 1:5 v/v. Titular con el permanganato de potasio (0.01M) (Apéndice IX).

Determinación de la concentración de fenoles totales por el método modificado de Singleton et al., 1999.

Se realizó a través de espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu como agente oxidante y preparando una curva patrón de ácido gálico con una solución estándar con una concentración de 0.2 mg/mL.

La muestra problema se preparó con una concentración de 1 g en 5 mL, de la cual se tomaron alícuotas de 250, 500 y 1000 μL , para luego completar a 1 mL con agua destilada y con 1.5 mL de Na_2CO_3 . Después de 2 horas de reacción a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 760 nm. Los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico por gramos de miel (mg eAG/g) (Apéndice XI).

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

Se realizó utilizando una curva patrón de quercetina (0-100 mg/L) y cloruro de aluminio (AlCl_3) al 2%. La solución problema se preparó con una concentración de 100 mg/mL, tomando alícuotas de 100, 200, 500 y 1000 μL con 1 mL de AlCl_3 cada una. Después de 10 minutos de reacción, se procedió a medir la absorbancia con el espectrofotómetro a 415 nm. Los resultados se expresan en mg equivalentes de quercetina por gramo de miel (mg eQ/g) (Apéndice XII).

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}). Para ello, se preparó una solución stock con 1 g en 5 mL de agua destilada y se hicieron alícuotas en un gradiente de concentraciones como están indicadas en el Cuadro 7 del Apéndice XIII. Estas fracciones, se pusieron a interaccionar con el radical, y por espectrofotometría se procedió a la evaluación de la reducción del DPPH por parte de la muestra (Apéndice XIII).

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Organismos utilizados

Se evaluó la actividad antimicrobiana de las tres muestras de miel contra las especies de bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos filamentosos y

levaduriformes de interés clínico, disponibles en el cepario del laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos.

Evaluación cualitativa

Se realizó a través del método de difusión en agar Kirby-Baüer (Vanden Berghe y Vlietnick, 1991) (Apéndice XIV), utilizando como control positivo sensidiscos impregnados con 25 µg de Cloranfenicol. Para evaluar la actividad antimicrobiana de la miel, se cavaron pozos en el agar con la boquilla de pipetas Pasteur, que se llenaron directamente con miel hasta llenar el pozo. La miel, al difundir por el agar, interaccionó con las bacterias en cada ensayo. El efecto se hizo evidente con la aparición de halos de inhibición y reducción del crecimiento, que fueron medidos y cuyos resultados se expresan en milímetros.

En el caso de los hongos filamentosos, se evaluó la actividad inhibitoria del crecimiento radial de éstos, utilizando un proceso similar al anterior descrito, donde se colocó el micelio del hongo en cuestión en el centro de la placa de agar papa dextrosa (PDA) y, dispuestos a una distancia equidistante, se cavaron tres pozos con la boquilla de una pipeta Pasteur con una profundidad de 4 mm, los cuales fueron rellenos en su totalidad con la muestra de miel, y después de 24 horas, se observó el resultado de la interacción entre la miel y el crecimiento del hongo. El control para este ensayo fue Ketonconazol (7 mg) (Wang, H. y Bun, T. 2002).

Por otro lado, la interacción de la miel con los hongos levaduriformes, se siguió el mismo proceso utilizado en las bacterias, cambiando únicamente el control positivo, siendo este Nistatina (25 µg) (CLSI, 2012).

Resultados y análisis

Propiedades físicas y organolépticas

Los resultados del análisis sensorial de las características organolépticas están reportados de acuerdo a los criterios descritos por la Norma Oficial Mexicana (NMX-F-036-1997) (Apéndice III) en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Caracterización sensorial organoléptica de las muestras de miel.

Propiedad	Miel 1	Miel 2	Miel 3
Color (mm escala Pfund)	Ámbar oscuro (>150)	Ámbar claro (72)	Ámbar claro (77)
Olor	Propio	Propio	Propio
Sabor	Agridulce	Dulce	Agridulce
Consistencia	Viscosa	Líquida	Líquida

Las características físicas como pH, densidad y humedad están reflejadas en el Cuadro 2 de acuerdo a las indicaciones del documento antes mencionado.

Cuadro 2 Características físicas de las muestras de miel.

Miel	Miel 1	Miel 2	Miel 3
pH	3.75±0.005	3.42±0.005	3.71±0.005
Densidad (g/mL)	1.4200±0.00005	1.1800±0.00005	1.3055±0.00005
Porcentaje de humedad (%)	12.8±0.05	16.7±0.05	18.5±0.05

El error asociado es el error absoluto para mediciones reproducibles (mitad de la mínima escala).

Propiedades bioquímicas de las muestras de miel

Cuantificación de los ácidos orgánicos

La reacción de neutralización entre los ácidos orgánicos de la muestra de miel con la solución titulante de NaOH 0.01N, y utilizando fenolftaleína al 1% como indicador, permitió determinar que la cantidad de ácidos orgánicos presentes en un kilogramo

de miel 1 es de 7.6 meq Ác.O/Kg; en la miel 2 es de 4.0 meq Ác. O/Kg, y finalmente, en la miel 3 es de 12.3 meq Ác.O./Kg

Cuantificación del ácido ascórbico

De la extracción y respectiva cuantificación del ácido ascórbico usando una curva patrón de la solución stock de ácido ascórbico (1 µg/mL) y midiendo la absorbancia a 760 nm, se pudo determinar que la concentración de este compuesto se encuentra en una concentración de 3.43 mg/g en la miel 1, en la miel 2 fue de 1.265 mg/g, y finalmente, de 1.124 mg/g en la miel 3.

Determinación de carbohidratos reductores totales por el método de Nelson-Somogy.

En la reacción de los azúcares reductores y el ion de cobre, se forma un óxido cuproso, que al reaccionar con arsenomolibdato se forma un complejo de color azul cuya concentración se puede medir y determinar el porcentaje equivalente que contiene la muestra de estos azúcares, siendo el valor calculado para glucosa de 36.0963% para la miel 1, 36.2444 % en la miel 2 y de 38.0222% para la miel 3.

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

El colorante azul de Coomasie pasa de rojo al azul característico cuando se une a las proteínas extraídas de la muestra de miel, de esta forma, por espectrofotometría, se determinó que el porcentaje de proteínas presentes es de 0.505% en la miel 1, 0.538% en la miel 2 y 0.024% en la miel 3

Determinación permanganométrica del peróxido de hidrógeno.

A través de la reacción de óxido reducción entre el KMnO_4 y el H_2O_2 , se puede determinar la concentración de este último de la solución problema la miel, encontrando una concentración de 2.040 mg/g en miel 1, en la miel 2 de 1.105 mg/g, y finalmente, de 2.125 mg/g en la miel 3.

Evaluación antioxidante

Cuantificación de fenoles totales.

La concentración de fenoles medida por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido reducción, siendo el reactivo de Folin-Ciocalteu el agente oxidante, resultó ser de 0.159 mg eAG/g para la miel 1, 0.093 mg eAG/g para la miel 2 y 0.9681 mg eAG/g para la miel 3.

]

Cuantificación de flavonoides totales.

Para el cálculo de la concentración de flavonoides presentes en la muestra de miel se procede a realizar la reacción de ésta con cloruro de aluminio, y a través de la curva de calibración se pudo determinar que los flavonoides están en una concentración de 0.233 µg eQ/g para la miel 1, 0.082 µg eQ/g para la miel 2 y 0.4717 µg eQ/g para la miel 3

Evaluación de la capacidad antioxidante por el método de reducción del radical DPPH

A través de una reacción colorimétrica entre el radical DPPH y la miel, se puede determinar la capacidad antioxidante media de la misma (CA₅₀), que corresponde a la concentración de 247.32 µg/mL para la miel 1, 252.66 µg/mL para la miel 2 y 100.15 µg/mL para la miel 3, comparando con la capacidad antioxidante de la quercetina que fue de 4.0 µg/mL

Actividad antimicrobiana

Pruebas cualitativas

La actividad antimicrobiana de la miel fue evaluada de manera directa, es decir, no se hicieron diluciones de ningún tipo, pues los pozos previamente hechos en la placa de agar fueron llenados con miel para ver la sensibilidad de cepas de bacterias Gram negativas y Gram positivas, hongos filamentosos y levaduriformes.

En este ensayo se observaron dos efectos producidos por la interacción entre las bacterias y las muestras de miel, siendo estos una disminución del crecimiento

haciéndose evidente como un halo menos turbio a comparación de las regiones de la placa donde no hubo interacción entre la miel y las bacterias; y una inhibición del crecimiento, donde no hay crecimiento bacteriano observable. El tamaño de los halos está reportado como el diámetro promedio de tres repeticiones en mm con su respectiva desviación estándar (Cuadro 3). El control positivo utilizado se administró en sensidiscos impregnados con 25 µg de Cloranfenicol. Esta prueba se analizó estadísticamente con un ANOVA de dos vías usando una $P < 0.0001$ (Figura 4), cuyos resultados indican que existen diferencias significativas entre las muestras de miel respecto a la inhibición de las bacterias. En comparación, las mieles 2 y 3 fueron las que mejor actividad antibacteriana tuvieron, más específicamente, la miel 2 tuvo mejor actividad contra las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, mientras que de las Gram negativas, fue mejor contra *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*; por otro lado, la miel 3 fue más efectiva contra *S. aureus* resistente a la meticilina, bacteria Gram positiva, y contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Pantoea agglomerans*, *Shigella flexneri* y *Proteus mirabilis* de las Gram negativas.

El efecto inhibitorio del crecimiento radial de los hongos filamentosos que tienen las muestras de miel esta reportado en el Cuadro 4, mientras que los datos de esta actividad sobre levaduras están indicados en el Cuadro 5.

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

Organismo	Miel 1		Miel 2		Miel 3		C+
	D	I	D	I	D	I	I
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 35668 ⁺	35.67±1.53	0.0	39.67±1.15	0.0	36.67±1.15	0	8 (R)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1239 ⁺	0.0	19.0±0.0	0.0	22.33±0.58*	0.0	20.00±1.00	24 (S)
<i>Staphylococcus aureus</i> 855 met. Resistente ⁺	0.0	14.33±.15	0.0	13.00±0.0	0	15.66±1.53*	17 (I)
<i>Staphylococcus epidermids</i> caso clínico ⁺	0.0	16.33±0.58	0.0	20.00±1.15*	0	16.00±1.73	0 (R)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 ⁻	0.0	11.00±0.0	0.0	11.00±0.0	0	11±0.0	10 (R)
<i>Pseudomonas aeuruginosa</i> CDBB-B 999 ⁻	36.67±5.03	12.00±2.65	29.67±6.81	7.67±6.66	31.33±1.15	14.00±2.00*	29 (S)

<i>Pantoea agglomerans</i> CDBB-B 959	37.67±2.52	12.33±2.31	37.67±1.15	14.00±1.00	35.33±2.52	20.3333±1.5275*	19 (S)
<i>Enterobacter cloacae</i> FES-C	0.0	5.33±4.73	0.0	12.00±0.0*	0.0	0.0	9 (R)
<i>Enterobacter aerogenes</i> FES-C	30.00±1.00	11.66±1.15	35.00±4.58	11.67±0.57*	29.33±0.57	10.00±1.00	9 (R)
<i>Escherichia coli</i> caso clínico	37.00±2.00	11.66±2.08	33.333±1.53	11.67±1.53*	32.00±1.00	10.67±1.15	8 (R)
<i>Shigella flexneri</i>	33.67±0.58	11.66±1.53	36.67±2.08	10.33±0.58	34.67±1.15	12.00±0.0*	10 (R)
<i>Proteus mirabilis</i> caso clínico	29.33±3.21	11.00±0.0	30.33±0.58	0.0	0.0	15.33±2.52*	13 (I)
<i>Vibrio cholerae</i> caso clínico	45.00±1.73	10.33±0.58	0.0	15.33±0.58*	45.33±3.05	13.67±2.08	25 (S)

Los halos medidos están reportados en mm y es el valor promedio de 3 repeticiones por cepa. Simbología: Disminución del crecimiento (D); Inhibición del crecimiento (I), 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.

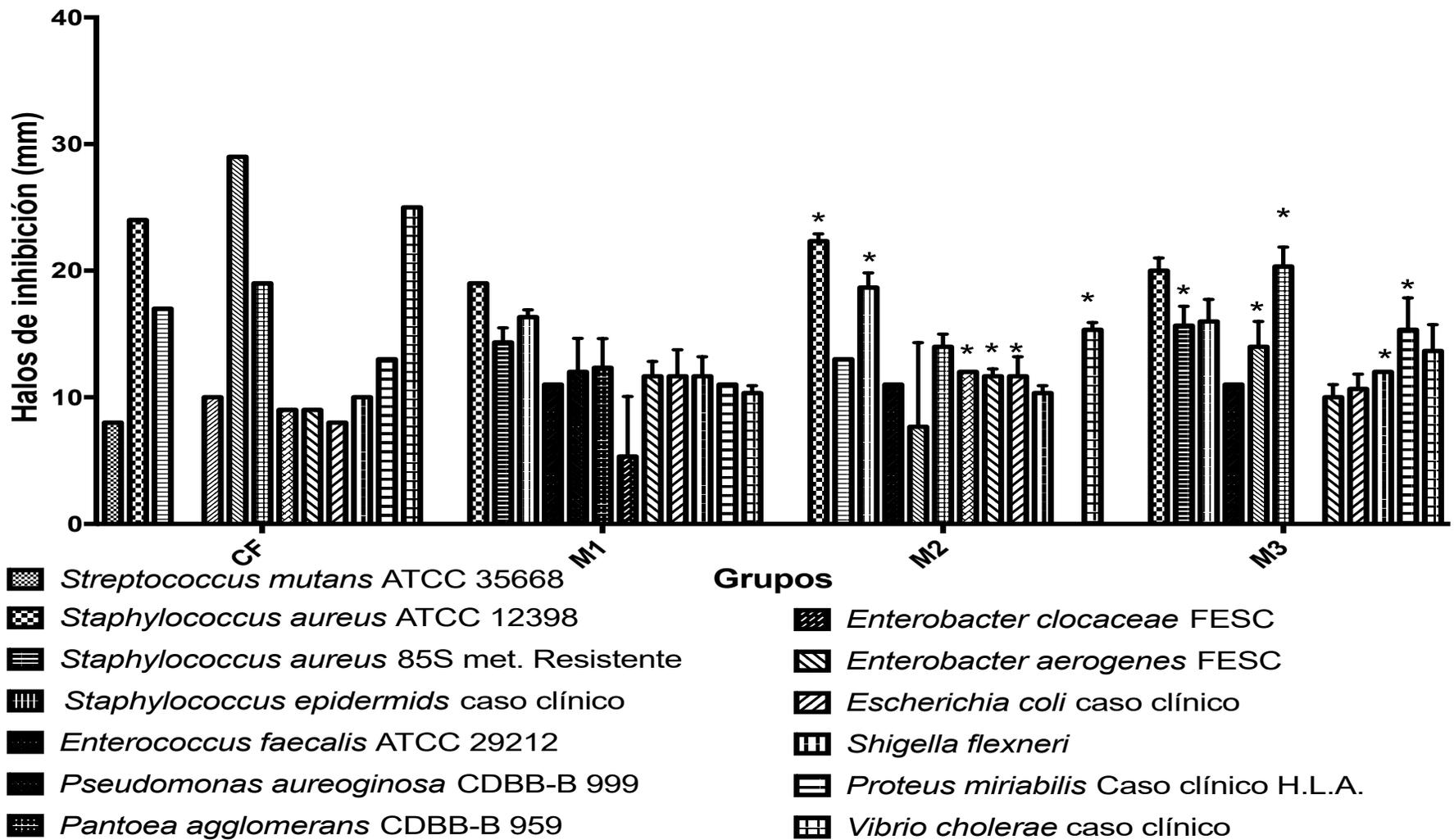


Figura 4 Actividad antimicrobiana de las tres muestras de miel. Se aprecia que hay diferencias significativas entre las muestras de miel y el grupo control CF (cloranfenicol). Entre las muestras de miel se encuentran diferencias significativas ($P < 0.0001$) indicadas por un asterisco (*).

Cuadro 4. Efecto inhibitorio de las muestras de miel en hongos filamentosos.

Organismo	Efecto			
	Miel 1	Miel 2	Miel 3	C+ (Ketonconazol 7 µg)
<i>Fusarium sporotrichioides</i> ATCC NRLL3299	+	++	+++	+++
<i>Fusarium moniliforme</i> CDBB-H-265	++	+	+++	+++
<i>Rhizoctonia lilacina</i> CDBB-H-306	+	+	++	+++
<i>Fusarium sp.</i>	+	+	++	+++
<i>Fusarium subglutinas</i>	+	+	++	+++
<i>Fusarium oxysporum</i>	+	+	++	+++
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> CDBB-H-1112	+	+	SEI	+++
<i>Aspergillus sp.</i>	SEI	SEI	SEI	+++
<i>Aspergillus niger</i> CDBB-H-179	SEI	SEI	+	+++

El efecto inhibitorio del crecimiento radial de los hongos están reportados cualitativamente bajo el siguiente código: Sin efecto inhibitorio (SEI), en este caso, el hongo creció más allá de los pozos con miel; efecto inhibitorio leve (+), el hongo se ve ligeramente inhibido por la miel, el hongo rodea el pozo; efecto inhibitorio moderado (++), el hongo tiende a evitar su crecimiento cerca del pozo con miel; efecto inhibitorio fuerte (+++), el hongo no crece cerca del pozo con miel, el crecimiento deja de ser radial y se ve una tendencia a crecer formando un triángulo. n=3

Cuadro 5. Efecto inhibitorio de las muestras de miel sobre hongos levaduriformes.

Organismo	Miel 1	Miel 2	Miel 3	C+ (Nistatina 25 µg)
<i>Candida albicans</i>	0.0	0.0	0.0	12.33±0.5
<i>Candida tropicalis</i>	11.0±1.5	0.0	9.0±0.6	11.33±0.57
<i>Candida glabrata</i>	0.0	0.0	0.0	12.66±0.57

Resultados promedio reportados en mm con su respectiva desviación estándar. n=3

Discusión

La miel es un alimento endulzante producido por *Apis mellifera* a partir de los néctares y otras secreciones de la flora circundante a los apiarios, lo que deriva en una amplia variedad de mieles con colores, sabores, aromas y otras características físicas y químicas particulares; es decir, la región donde la miel sea colectada, tiene influencia en los rasgos distintivos de la misma. Es una fuente importante de carbohidratos, vitaminas y minerales, además de otros compuestos que le brindan propiedades conocidas por la medicina tradicional a lo largo de la historia en diferentes civilizaciones (Apéndice 1). En este trabajo se compararon las características bromatológicas y las propiedades nutraceuticas, actividad antioxidante y antimicrobiana de tres mieles provenientes de diferentes regiones de México.

En el análisis bromatológico, iniciando por las características organolépticas (Cuadro 1), se pueden apreciar diferencias claras entre las tres mieles. La miel 1, proveniente de San Jerónimo Tecóatl, Oaxaca, tuvo un sabor agrisado, un aroma particular agradable y fuerte con ligeras notas de café, lo cual coincide por su origen, que, de acuerdo al apicultor que la proporcionó, hay cafetales circundantes al apiario donde se extrajo esta muestra, de acuerdo al fotómetro, el color de esta miel es ámbar oscuro; en cuanto a la consistencia, resultó ser la más viscosa de las tres muestras, muy parecida a una pasta. Por otro lado, la miel 2, de Texcoco, Estado de México, se caracterizó con un aroma dulce y agradable, así como su sabor, que tenía la característica de ser más dulce al gusto, en cuanto a su color, de acuerdo al fotómetro, es ámbar claro; la consistencia era de las más fluidas de las muestras. Finalmente, la miel 3, proveniente de Tenosique, Tabasco, se destacó por su sabor ligeramente ácido y dulce, con un aroma que recuerda a los cítricos, lo que coincide con lo mencionado por el apicultor, quien refirió que en la zona había árboles de este tipo; de color ámbar claro, de acuerdo al fotómetro, esta miel contaba con una consistencia más viscosa que la segunda muestra, pero sin llegar a parecer una pasta como la primera. De acuerdo con estas observaciones, se puede apreciar que hay características particulares que distinguen a las muestras de miel de acuerdo a

su procedencia tal como lo indica PROFECO (2001) y al Norma Mexicana de la miel (NMX-F-036-1997), más adelante, se discutirán los aspectos físicos y químicos de las muestras de miel (Cuadro 2), así como la relación que tiene el color con la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fitoquímicos.

Uno de los aspectos fisicoquímicos importantes en la miel es la acidez, y las tres mieles tuvieron un pH ácido, la miel 1 tuvo un valor de acidez de 3.75, la miel 2 de 3.42 y la miel 3, de 3.71. Lo que indica que, independientemente de su origen, las tres mieles tienen un pH bajo, lo que también se ve reflejado en el contenido de ácidos orgánicos, cuyas concentraciones son las siguientes, en la miel 1 es de 7.6 meq Ác.O/Kg; en la miel 2 es de 4.0 meq Ác. O/Kg, y finalmente, en la miel 3 es de 12.3 meq Ác.O./Kg. De acuerdo con los parámetros de calidad del CODEX Norma de la miel (2001) y PROFECO (2001), los contenidos de los ácidos orgánicos no deben sobrepasar los 50 meq Ác. O./kg de miel, por lo que las tres mieles cumplen con ese requisito de calidad. La acidez es el reflejo del contenido de los ácidos orgánicos provenientes del tipo de flora y la temporada de extracción (Rodríguez et al., 2012), los cuales están considerados en un rango de porcentaje del 0.17 al 1.17%; así como del contenido de aminoácidos, que se encuentran entre el 0.05 al 0.1% (National Honey Board, 2005).

En el perfil químico elaborado por Viuda-Martos et al., (2010) para diez muestras de mieles del estado de Tabasco, se encontró que las mieles de esa localidad están en un rango de acidez entre 3.25 y 3.97, atribuido a la presencia de los ácidos orgánicos, principalmente al ácido glucónico lo que coincide con los resultados de este trabajo respecto a la miel de Tenosique, Tabasco. De las otras regiones, Oaxaca y Estado de México, no se encontraron caracterizaciones fisicoquímicas de mieles producidas en esos estados. Sin embargo, Zavala y colaboradores (2013), realizaron una caracterización de mieles tropicales de México y Guatemala, donde se menciona que la miel monofloral de campanilla (*Ipomoea purpurea*), una flor muy común en los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas, y una

de las principales fuentes de néctar de *Apis mellifera* en la zona; tiene un pH promedio de 3.58, valor semejante al encontrado en la miel 2.

La baja humedad en la miel es una característica distintiva de este alimento, lo que le da una alta osmolaridad, un aspecto importante en la actividad antimicrobiana que se discutirá más adelante. Esta propiedad fue medida con un refractómetro digital, que da como resultado el porcentaje de agua que contiene la muestra de cada miel. Para la miel 1 se encontró un contenido de agua del 12.8%, la miel 2 resultó tener el 16.7%, y finalmente la miel 3, contó con un 18.5% de humedad. Tomando en cuenta los límites de humedad que dicta la Norma mexicana de la miel (NMX-F-036-1997) y el CODEX Norma de la miel (2001), 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. El contenido de agua va a depender de la temporalidad, del proceso de envasado y almacenaje de la miel, y de ella, junto a la temperatura, depende la viscosidad de la miel (National Honey Board, 2005), razón por la cual, la miel 1 fue la más viscosa de las tres muestras, pues es la que menor contenido de humedad reporta en su composición.

Una parte representativa de la composición de la miel son los azúcares, que ocupan, en promedio, más del 80% del total, siendo la fructuosa el monosacárido más abundante, presente en alrededor del 38.5 % de la composición total, seguida de la glucosa, con un 31% aproximadamente, luego, en menor cantidad están los disacáridos como la maltosa y la sacarosa, presentes en un 7.20% y 1.5% respectivamente (Doner, 1977; National Honey Board, 2005). Para determinar el contenido de azúcares en las muestras de miel, se determinó la concentración porcentual de los azúcares reductores, como las aldosas y las cetosas, a los cuales pertenecen la fructuosa y la glucosa (Campbell y Farrell, 2010); a través del método de Nelson-Somogyi (Apéndice V), con el cual se encontró que la miel 1 posee 36.0963% de glucosa, 36.2444 % en la miel 2 y de 38.0222% para la miel 3; lo cual coincide con lo mencionado por Doner (1977), PROFECO (2001) y el National

Honey Board (2005) al encontrar en la glucosa y la fructuosa en un porcentaje similar al que manejan los mencionados. Nava-Ramírez (2016) trabajó con las muestras de miel 1 y miel 2, encontrando que la composición total de carbohidratos para estas muestras es la siguiente: 92.91% para la miel 1 y 90.06% en la miel 2, cuantificados a través del método de cuantificación con el reactivo de Antrona, además, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), pudo determinar que, en la miel 1, la fructuosa se encuentra en una concentración de 448 µg/mg, seguida de la glucosa con 308 µg/mg, además de la presencia de maltosa, un disacárido presente en una concentración de 61.8 µg/mg; mientras que en la miel 2, la fructuosa estaba en una concentración de 568 µg/mg, la glucosa en 370 µg/mg, y la maltosa en 82 µg/mg. Lo anterior confirma el hecho de que es la fructuosa el monosacárido más abundante en la composición general de la miel. El protocolo de Nelson-Somogyi utiliza glucosa para calcular la concentración de este azúcar en muestras problemas, se puede calcular la concentración de esta en la miel 3, aunque no con la precisión de un HPLC.

Durante la preparación de la miel, las abejas añaden enzimas metabolizadoras de carbohidratos como la glucoxidasa, una enzima que transforma a los azúcares en peróxido de hidrógeno en condiciones aerobias con el propósito de prevenir el deterioro de la miel por microorganismos durante el proceso de maduración. La glucoxidasa permanece inactiva en la miel madura, pero cuando la miel se disuelve en agua, la enzima se activa y se produce hasta un 50% de peróxido de hidrogeno, sin embargo, la acumulación de éste depende de la naturaleza del néctar que la abeja haya recolectado, pues, por ejemplo, existen plantas cuyas secreciones llevan peroxidadasas, razón por la cual existan variaciones en la actividad de la glucoxidasa entre las muestras de miel (Kwakman y Saat, 2012), lo cual se ve evidenciado en las mieles analizadas en este trabajo, donde se encontró que el H₂O₂ está en concentraciones de 2.040 mg/g en miel 1, en la miel 2 de 1.105 mg/g, y finalmente, de 2.125 mg/g en la miel 3.

Las proteínas se encuentran en menor proporción en la composición de la miel, incluso, 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%, acompañadas del 0.05-0.1% de aminoácidos y del 0.043% de otros compuestos nitrogenados no identificados; y, aunque estén en pequeñas cantidades, las enzimas presentes, incorporadas por las abejas durante diferentes fases de la preparación de la miel, tienen un papel importante en las propiedades funcionales de la miel; las enzimas predominantes son la diastasa (amilasa), que transforma el almidón en carbohidratos sencillos como dextrinas, oligo, di, y monosacáridos; y la glucosa oxidasa, que como se mencionó previamente, transforma a los carbohidratos en peróxido de hidrógeno. Un análisis de las propiedades nutrimentales de las mieles del área Atlántica Europea, reporta un intervalo que va del 0.70 al 1.00% del contenido de proteínas, enfatizando el hecho de que estos nutrientes se encuentran en menor proporción y están representados por las enzimas previamente mencionadas (Escudero et al., 2013).

En las muestras analizadas se encontraron cantidades similares a través del método de cuantificación de proteínas por el método de Bradford, 0.505% en la miel 1, 0.538% en la miel 2 y 0.024% en la miel 3; los resultados para la muestra 1 y 2, coinciden con lo reportado por Nava-Ramírez (2016), sin embargo, como se puede ver, la miel 3 presentó un menor contenido proteico, pero una purificación y análisis de las proteínas por electroforesis (Sánchez, 2013) permitiría obtener mayor información sobre el contenido y naturaleza de las proteínas inmersas en la miel de cualquier región, de lo cual saldría una caracterización más completa sobre las propiedades funcionales de las mieles, como la actividad antibacteriana, que será discutida más adelante.

Hasta ahora se ha hablado de algunos elementos y características intrínsecas de la miel, y como estas cambian o se mantienen ligeramente similares entre las muestras de diferentes regiones. Aunque aún faltan elementos que están

referidos en el National Honey Board, que ampliarían la caracterización de estas y otras muestras en la miel, como el contenido de minerales, los cuales, de acuerdo con Escudero et al., (2013), la cantidad de éstos también cambian de acuerdo a su origen floral. Lo siguiente en la discusión es hacer referencia a las propiedades medicinales a la miel que los elementos descritos le brindan, requisito para que este alimento entre en la categoría de nutraceutico (Kalra, 2003), que en el caso de este trabajo se analizó la capacidad antioxidante y antimicrobiana, aunque se hará mención de la actividad cicatrizante y antiinflamatoria.

En la actualidad, se ha buscado la aplicación de sustancias antioxidantes para tratar enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como lo son el cáncer, desórdenes cardiovasculares, degeneración macular, cicatrización irregular de heridas, inflamaciones gastrointestinales y otros procesos inflamatorios; y esas sustancias, como la vitamina C, fenoles y flavonoides, han demostrado tener una fuerte actividad antioxidante, las cuales se pueden encontrar en alimentos naturales como la miel, que ha probado contener compuestos antioxidantes como la vitamina C y E, además de enzimas como la catalasa y compuestos fenólicos (Aljadi y Kamaruddin, 2004).

En las muestras de miel analizadas, las concentraciones de los fenoles fueron de 0.159 mg eAG/g para la miel 1, 0.093 eAG/g para la miel 2 y 0.9681 mg eAG/g para la miel 3, las concentraciones de flavonoides fueron 0.233 µg eQ/g para la miel 1, 0.082 µg eQ/g para la miel 2 y 0.4717 µg eQ/g para la miel 3. Por otro lado, la vitamina C está contenida en las muestras de la siguiente forma: 3.43 mg/g en la miel 1, en la miel 2 fue de 1.265 mg/g, y finalmente, de 1.124 mg/g en la miel 3. La capacidad antioxidante de estos compuestos se ve reflejada en la reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picridacil (DPPH), donde la miel 1, 2 y 3, tuvieron una capacidad antioxidante media (CA₅₀) bajo las respectivas concentraciones siguientes; 247.32 µg/mL, 252.66 µg/mL, 100.15 µg/mL, comparando con la actividad antioxidante de la quercetina que fue de 4.0 µg/mL. Estos resultados indican que la miel 3, de Tenosique, Tabasco (M3) tiene una mejor actividad

antioxidante que las otras dos muestras, lo que puede deberse al alto contenido que tiene de fenoles y flavonoides en comparación a las otras dos. Los resultados de la muestra 1 y 2 ya habían sido reportados por Nava-Ramírez (2016) haciendo uso de los mismos ensayos, los cuales se mantuvieron constantes en cuanto a la actividad.

Estudios referentes a la capacidad antioxidante de mieles nacionales, como el de Ruíz-Navajas et al., (2011), quienes analizaron la actividad antioxidante de mieles multiflora artesanales del estado de Tabasco, de las cuales cuatro muestras provienen del mismo municipio que la miel 3, Tenosique; reportan que el contenido de compuestos fenólicos de las mieles de este estado oscila entre 0.5132 y 1.3402 mg eAG/g de miel, lo que concuerda con los resultados de este trabajo. En cuanto al contenido de flavonoides, el rango de concentraciones reportadas va desde 0.2958 hasta 1.8708 mg/g de miel, siendo la miel de Estapilla, Tabasco, la correspondiente a la concentración más baja. Es importante hacer la observación que la colecta de miel en el estudio de Ruíz-Navajas et al., (2011), corresponde al periodo entre febrero y abril del 2005, mientras que la miel analizada en este trabajo corresponde al verano del 2015, lo que indica que el contenido de los compuestos fenólicos y de flavonoides tiende a cambiar de acuerdo a la temporada de colecta, lo que confirma el hecho de que las condiciones de la flora, influenciadas por la estacionalidad, se ven reflejadas en las propiedades de la miel, pues, además, en el ensayo de la reducción del DPPH, es la muestra de Estapilla la que tiene una actividad antioxidante del 32.6%, la más baja dentro de ese estudio, mientras que la miel monofloral de coco de Comalcalco, con una concentración superior a 1.20 mg eAG/g, tuvo una actividad antioxidante del 82%.

En otro estudio con mieles mexicanas, Rodríguez et al., (2012), evaluaron el contenido fenólico y su actividad antioxidante, encontrando que las mieles monoflorales de naranja y eucalipto tienen el más alto contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, a comparación de otras muestras multiflorales de origen no reportado por los autores, además, mencionan que otros compuestos como el ácido ascórbico, podrían participar también en la actividad antioxidante de

la miel. Sin embargo, los resultados de este trabajo no muestran una relación entre el contenido del ácido ascórbico con la actividad antioxidante, pues la Miel 1 tuvo un mayor contenido de esta molécula, pero fue la Miel 3 la que tuvo una mejor reducción del radical DPPH, a pesar de tener una concentración menor y similar a que tuvo la Miel 2, la cual presentó la actividad antioxidante más baja en la prueba mencionada.

En un estudio con diferentes muestras de mieles monoflorales, se identificaron los compuestos fenólicos responsables de la actividad antioxidante a través de una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), teniendo como resultados diferentes perfiles cromatográficos, pero con tres flavonoides principales en cada muestra: las flavononas pinobanksina y pinocembrina, y las flavonas crisina y galangina; además de otros compuestos desconocidos con naturaleza fenólica. El trabajo concluye que, la actividad antioxidante es el resultado de la acción combinada entre los diferentes y ampliamente variados compuestos que están embebidos en la miel, como lo son los compuestos fenólicos, péptidos, ácidos orgánicos y enzimas (Gheldof et al., 2002).

La actividad antimicrobiana de la miel se ha observado desde las civilizaciones más antiguas, donde se recomendaba su uso tópico para curar infecciones y heridas, por ejemplo, en la Grecia antigua, Aristóteles la recomendaba como ungüento para tratar heridas y el dolor de ojos; Dioscórides la proponía como un tratamiento para las úlceras infectadas y manchas en la cara. Además, los egipcios, romanos, asirios y chinos, la usaban en combinación con otras hierbas para tratar enfermedades intestinales (Ulloa et al., 2010)

Esta propiedad se debe al conjunto de las características fisicoquímicas de la miel, como la baja humedad que genera estrés osmótico, el pH ácido y la presencia de peróxido de hidrógeno, cuya presencia en la miel ya fue explicada anteriormente, se había considerado como el principal agente antimicrobiano que esta posee, pero, los elementos fitoquímicos como los fenoles, de los cuales solo

se ha identificado a la pinocembrina, mientras que otros solo se identificaron como moléculas parecidas; y péptidos, que las abejas impregnan en la miel durante su preparación, como las defensinas, antibióticos característicos de los artrópodos, de los cuales aún se sabe muy poco. Esta propiedad ha sido evaluada en bacterias de interés clínico como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. y *Pseudomonas aeruginosa*, donde se ha comparado con antibióticos de amplio espectro y se ha visto que *S. aureus* muestra mayor sensibilidad a la miel; siendo común la mención constante de que ésta es altamente dependiente de la fuente floral (Kwakman y Zaat., 2012; Libonatti et al., 2014).

En este trabajo, la actividad antimicrobiana de las tres mieles fue evaluada contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Cuadro 3), siendo las Miel 2 y la Miel 3 las más efectivas, sin embargo, eso no significa que la Miel 1 no haya tenido efecto. Todas las bacterias probadas tuvieron una inhibición en su crecimiento, no mayor al producido por el control positivo (Cloranfenicol), pero sí evidente en ambos tipos de bacteria. Como se mencionó antes, este efecto se debe a la interacción de todos los elementos intrínsecos de la miel y dependiente de las características de la flora circundante de al apiario.

En el estudio de calidad y propiedades antimicrobianas de mieles mexicanas realizado por Rodríguez et al., (2012), además de evaluar la actividad antioxidante, se evaluó la actividad antimicrobiana, encontrando que las mieles monoflorales de *Campanula persiciflora*, *Citrus sinensis*, y *Eucalyptus globulus labill* fueron las que mejor inhibieron a los microorganismos evaluados, *Bacillus cereus* ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* Scott A., *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, este último ha sido probado con una miel monofloral de manuka (*Leptospermum scoparium*) proveniente de Nueva Zelanda, la cual, actualmente, ha sido refinada y se ha comercializado como una miel de grado médico; realizando diluciones de hasta el 2.88% (v/v) con el propósito de probar que la actividad antimicrobiana no es totalmente dependiente de la alta osmolaridad, sino del conjunto de los compuestos fitoquímicos; encontrando

inhibición completa del microorganismo 24 horas después (Cooper et al., 1999; Kwakman y Zaat, 2012). En este trabajo, se observó una inhibición considerable hacia una cepa de *Staphylococcus aureus* por parte de las tres muestras de miel, por lo que se sugiere llevar a cabo, para estudios posteriores, el mismo protocolo de dilución de miel para probar la sensibilidad y la dinámica de crecimiento de las bacterias disponibles en el cepario del laboratorio de Farmacognosia.

Los resultados de la interacción del conjunto de todos elementos de la miel contra los organismos utilizados, son evidencia de la propiedad antimicrobiana, que no se limita a los organismos procariontes, sino también en algunos organismos eucariontes como los hongos filamentosos (Cuadro 4), más específicamente contra *Fusarium sporotrichioides* ATCC NRLL3299 y *Fusarium moniliforme* CDBB-H-265, siendo el primero, un organismo capaz de provocar de micosis oportunistas en personas inmunocomprometidas (Kano et al., 2011). Es importante hacer la observación de que, al momento de escribir éste trabajo, no se encontraron estudios del efecto de la miel en el crecimiento de organismos eucariontes como los hongos filamentosos ni en levaduras infecciosas como las del género *Candida*, de las cuales, en este trabajo, solo *Candida tropicalis* (Cuadro 5), fue ligeramente susceptible a las Mieles 1 y 3.

El efecto observado de la aplicación directa de la miel sobre los microorganismos, sugiere que es la razón por la cual ha funcionado como remedio tópico a lo largo de la historia.

La importancia de éste trabajo y sus resultados en la sociedad es que le da un respaldo científico al apicultor, con lo que ayudaría a incentivar la venta de su producto, pues realza el valor del mismo, además, si se le da continuación a la caracterización de mieles a lo largo y ancho del territorio mexicano, se puede ampliar el conocimiento de las diferentes variedades de mieles que son producidas en el país y ayudar a los pequeños grupos de apicultores. Esto permitiría ampliar y fortalecer la producción de la miel, pues se incentiva la compra-venta nacional e internacional y la protección a los ecosistemas de los cuales depende este producto. También se abre la oportunidad de encontrar mieles de grado médico con diferentes

propiedades, tal como lo ha hecho Nueva Zelanda con la miel de manuka (Kwakman y Zaat, 2012).

Conclusiones

- Las características físicas y químicas de las tres muestras de miel evaluadas están dentro de los parámetros de calidad.
- Cada muestra de miel tiene características y propiedades particulares.
- Las tres muestras de miele cuentan con actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas debido a sus características físicas y químicas, así como, probablemente, a los elementos fitoquímicos y proteicos adicionales.
- Las tres mieles cuentan con capacidad antioxidante, siendo la miel de Tenosique, Tabasco la que presenta mayor capacidad en relación al contenido superior de fenoles y flavonoides.
- La calidad de las muestras de miel, la capacidad antioxidante y la actividad antimicrobiana, hacen de éstas, alimentos nutraceuticos.

Apéndice I. La miel

La miel es una sustancia producida por las abejas a partir del néctar que las plantas producen para incentivar su polinización. Ésta es la razón por la que existe una amplia variedad de mieles, pues el néctar que recolectan, cambia en cuanto a la cantidad y tipos de azúcares, vitaminas, sales minerales, proteínas y aminoácidos, de acuerdo a su origen, sin embargo, existe una composición general que esta descrita a continuación (Cuadro 6).

Cuadro 6. Composición general de la miel (PROFECO, 2001).	
Nutriente	Cantidad promedio en 100 g
Agua	17.1 g
Carbohidratos (totales)	82.4 g
Fructuosa	38.5 g
Glucosa	31.0 g
Maltosa	7.2 g
Sacarosa	1.5 g
Proteínas, aminoácidos, vitaminas y minerales	0.5 g
Energía	305 Kcal
Grasas (lípidos)	0.0 g
Colesterol	0.0 g
Vitaminas	
Tiamina	<0.0 mg
Riboflavina	<0.06 mg
Niacina	<0.36 mg
Ácido pantoténico (B5)	<0.11 mg
Piridoxina (B6)	<0.32 mg
Ácido ascórbico	2.2-2.4 mg
Minerales	
Calcio	4.4-9.20 mg

Cobre	0.003-0.10 mg
Fierro	0.06-1.5 mg
Magnesio	1.2-3.5 mg
Manganeso	0.02-0.4 mg
Fósforo	1.9-6.3 mg
Potasio	13.2-16.8 mg
Sodio	0.0-7.6 mg
Zinc	0.03-0.4 mg

Al momento de coleccionar el néctar, la abeja segrega y vierte sobre éste, varias enzimas provenientes de sus glándulas salivales, como la invertasa, que transforma la sacarosa en glucosa y fructuosa; la amilasa, que rompe la amilosa, un polisacárido, en varias moléculas de glucosa, un monosacárido que es más sencillo de digerir; y la glucosa oxidasa, que estabiliza el pH; entre otras.

Dentro del panal, el área donde se procesa y almacena la miel, se mantiene con condiciones de temperatura a 35° C y constante ventilación producida por el batir de las alas de las abejas, lo que da lugar a la evaporación del agua, que, cuando se reduce al 20%, la miel se considera lista, por lo que las abejas cierran con una capa de cera cada celda donde está almacenada. Finalmente, la miel funciona para las abejas como una reserva de alimento cuando no hay flores.

Como se mencionó al principio, las características de la miel dependen del origen del néctar que es recolectado, lo que se hace evidente en el color, sabor y aroma. Por ejemplo, las mieles elaboradas con néctar de girasol tienen un color dorado; las que se elaboran con agave le dan un sabor desabrido; las mieles oscuras tienen un sabor generalmente fuerte y un alto contenido mineral; las mieles se cristalizan dependiendo del contenido de glucosa; entre otras.

Para su cosecha, los apicultores consideran la miel lista cuando está sellada con una capa de cera, pues está en un estado fresco y puro. Utilizando materiales sencillos, incluso los apicultores rurales pueden producir de alta calidad.

La miel ha estado presente en casi todas las civilizaciones a lo largo de la historia, y ha sido utilizada como alimento de alto valor nutritivo. De acuerdo a la evidencia arqueológica, se ha dado uso a la miel desde el Mesolítico, 7000 años a.C.; los Sumerianos la utilizaban como ungüento durante los años 2100-2000 a.C. de acuerdo a una tablilla encontrada; los antiguos egipcios, asirios, chinos y romanos, la utilizaban con hierbas para tratar heridas y enfermedades intestinales; en Grecia, Aristóteles la recomendaba para tratar heridas cutáneas, y Discórides, para el tratamiento de manchas y quemaduras. Actualmente, dentro de la medicina tradicional, se sigue recomendando su uso como tratamiento tópico contra infecciones y dolor de garganta.

La capacidad antibacteriana de la miel está atribuida al contenido de peróxido de hidrógeno, flavonoides, ácidos orgánicos, enzimas, alta osmolaridad, bajo pH, antioxidantes y a otras sustancias que siguen sin identificarse. También es por ello que se considera un importante complemento alimenticio que fortalece el sistema inmune y para tratar procesos inflamatorios.

(Bee culture, 2016; CODEX NORMA DE LA MIEL, 2001; FAO, 2017; National Honey Board, 2017; PROFECO, 2001; Ulloa et al., 2010)

Apéndice II. Resistencia a los fármacos antimicrobianos

La resistencia a los antibióticos es la capacidad que los microorganismos adquieren para evitar ser susceptibles a los efectos de un antibiótico. Es una propiedad característica de prácticamente todos los microorganismos.

Los genes responsables de la resistencia a los antibióticos están ubicados generalmente en un plásmido R (de resistencia), que puede ser transmitido horizontalmente.

Por ejemplo, la resistencia al cloranfenicol se debe a un plásmido R que codifica una enzima que acetila al fármaco; en el caso de las penicilinas, el anillo β -lactámico que las distingue, puede ser degradado por la β -lactamasa, una enzima codificada por otro plásmido R de algunas bacterias.

Otros mecanismos que pueden desarrollar las bacterias para protegerse de los antibióticos, además de la inactivación de los mismos, son: reducción de la permeabilidad, alteración de la diana, desarrollo de vías bioquímicas resistentes al agente, desarrollo de bombas de expulsión.

(Madigan et al., 2015)

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

De acuerdo a la Norma Mexicana de la miel (NMX-F-036-1997), las especificaciones que el producto Miel debe cumplir son las siguientes:

Especificaciones sensoriales

Color: Propio, característico. Variable de: Blanca agua, extra blanca, blanca, extra clara ámbar, ámbar claro, ámbar y oscura.

Olor: Propio característico.

Sabor: Propio característico.

Especificaciones fisicoquímicas

Cuadro 7 Especificaciones fisicoquímicas de la miel

Especificaciones	Mínimo	Máximo
Contenido aparente de azúcar reductor expresado como % (g/100g) de azúcar invertido	63.88	-
Contenido de sacarosa % (g/100g)	-	5.00
Contenido de glucosa % (g/100g)	-	38.00
Humedad % (g/100g)	-	20.00
Sólidos insolubles en agua % (g/100g)	-	0.30
Cenizas % (g/100g)	-	0.60
Acidez expresada en miliequivalentes de ácido/Kg	-	40.00
Hidrometilfurfural (HMF) expresado en mg/Kg en miel envasada. De más de 6 meses	-	80.00
Hidrometilfurfural (HMF) expresado en mg/Kg en miel envasada. De menos de 6 meses	-	40.00
Índice de distasa	-	8.00*
Para las mieles con bajo contenido enzimático, el índice mínimo de distasa en la escala de Goethe será de 3.0 siempre y cuando no exceda en el contenido de HMF de 15 mg/Kg		

Especificaciones microbiológicas

No debe contener microorganismos patógenos, toxinas microbianas e inhibidores microbianos.

Materia extraña objetable

La miel debe estar libre de fragmentos o excretas de insectos y/o roedores, así como de cualquier otra materia extraña.

Aditivos, inhibidores y adulterantes.

No se permite el uso de aditivos alimentarios para su conservación, diluirla en agua, ni mezclarla con almidones, melazas, glucosa, dextrinas, fructuosa u otros azúcares. No se permite el uso de inhibidores microbianos.

Contaminantes químicos.

La miel no debe contener ningún contaminante químico en cantidades que constituyan un riesgo para la salud.

Apéndice IV. 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.

La normalidad es útil porque se considera que una mol equivalente de ácido neutralizará una mol equivalente de base (Chang, 2007).

Es por ello que se utiliza una solución con normalidad 0.01 de NaOH y una solución de fenolftaleína al 1% en alcohol al 96% como indicador.

Procedimiento:

1. Pesar 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 10 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 a la siguiente formula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

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 V. Determinación de carbohidratos por el método de Nelson-Somogyi

Extracción de carbohidratos de una muestra de miel.

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

Cuantificación de carbohidratos

Los azúcares reductores como la glucosa reaccionan con el reactivo de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 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 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. La sensibilidad es de 25 a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La curva patrón que se utiliza para la cuantificación está expresada en el cuadro 8.

Cuadro 8 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 hirviente 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 utilizando el tubo 1 como blanco.

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 VI. Cromatografía líquida de alta resolución para carbohidratos (HPLC)

La cromatografía es una técnica de separación de los elementos de una mezcla utilizando dos fases, una móvil y una estacionaria, que se mueven una respecto a otra manteniendo un contacto íntimo. La muestra se introduce junto a la fase móvil y los componentes de la muestra se distribuyen y recorren a diferentes tiempos ambas fases, lo que resulta en la separación de éstos.

En el HPLC (High Performance Liquid Chromatography), la muestra pasa mediante el bombeo con alta presión del líquido (fase móvil) a través de la columna cromatográfica por la fase estacionaria, la cual presenta pequeñas partículas con ciertas características químicas en su superficie. Los elementos de la muestra se retrasarán diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas que tengan con las partículas de la fase estacionaria mientras la recorren, lo cual depende de la naturaleza de cada compuesto. El tiempo que tarda un compuesto en ser eluído de la columna es llamado tiempo de retención y se le considera una propiedad característica que lo identifica en una determinada fase móvil y estacionaria. La presión incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna, reduciendo su difusión dentro de la misma mejorando la resolución de la cromatografía.

Después de realizar la extracción de carbohidratos, se inyectan 30 μL de la muestra al HPLC, el cual cuenta con una columna para carbohidratos (SUPERGEL™ CA) de 30 cm x 7.8 mm. La fase móvil es agua y está acoplado a un detector de refracción de luz.

El cromatograma es comparado con muestras estándares, para ello se utilizan: fructuosa, sacarosa, maltosa, inulina, y glucosa; que son preparados con 1 mg en 1 mL de agua destilada. Se inyectan de igual forma 30 μL al HPLC.

Se solapan los cromatogramas utilizando el programa Instrument (Online) Method & Run control, donde se pueden comparar los tiempos de retención y longitud de refracción para finalmente calcular el contenido de cada componente en la muestra de miel con la altura de cada pico.

(Gros et al., 1985; Mathews et al, 2002)

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

Esta técnica está diseñada para obedecer las leyes de Beer-Lambert utilizando una concentración de hasta 45 μg de ácido ascórbico.

Extracción del ácido ascórbico de una muestra de miel.

1. Pesar 100 mg de miel y añadir 900 μL 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 500 μL del sobrenadante y se diluyen en 4.3 mL de agua destilada en conjunto de 0.2 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, agitando hasta homogenizar. Para preparar una solución stock de ácido ascórbico se disuelven 1 mg de éste en 5 mL de agua, para posteriormente construir la curva patrón referida en el cuadro 9.

Cuadro 9 Curva patrón para la cuantificación de ácido ascórbico con reactivo de Folin-Ciocalteu

Tubo	Ác. ascórbico (μg)	Vol. de la solución stock (μL)	Reactivo Folin (2N)(mL)	Agua destilada (mL)	Problema (μL)
0	0	0	0.2	4.8	0
1	5	25	0.2	4.775	0
2	10	50	0.2	4.75	0
3	15	75	0.2	4.725	0
4	20	100	0.2	4.7	0
5	25	125	0.2	4.675	0
6	30	150	0.2	4.65	0
7	35	175	0.2	4.625	0
8	40	200	0.2	4.6	0
9	45	225	0.2	4.575	0

10	50	250	0.2	4.55	0
11	60	300	0.2	4.5	0
12	70	350	0.2	4.45	0
13	80	400	0.2	4.4	0
14	90	450	0.2	4.35	0
15	100	500	0.2	4.3	0
Problema	--	--	0.2	4.3	500

Una vez dispuestos los tubos de acuerdo a 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 VIII. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Esta técnica está basada en la formación de un complejo entre el colorante azul brillante de Coomasie 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 pesan 25 mg de miel y se homogeniza con 1 mL de una mezcla de metanol-cloroformo-agua (12:5:3). Esto se realiza por duplicado, para tener dos tubos con la misma mezcla. Se procede a centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos.

La solución stock de albumina 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 10.

Cuadro 10. 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 reacciones son llevadas a cabo en una placa de ELISA y se leen en el espectrofotómetro a 595 nm.

Reactivo de Bradford:

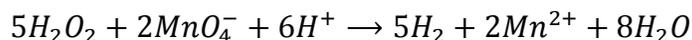
Pesar 100 mg de azul de Coomasie G-250 y se disuelven en 50 mL de etanol al 96%. Agregar 100 mL de ácido fosfórico al 85%, aforar a 1L con agua destilada, filtrar y almacenar en frasco ámbar, madurar durante 12 horas.

(García y Vázquez, 1998; Sánchez, 2013)

Apéndice IX. Determinación permanganométrica de peróxido de hidrógeno.

En las reacciones de óxido-reducción hay una transferencia de electrones, de tal forma que hay especie que cede (se oxida) y otra que acepta (se reduce) electrones; el número de electrones cedidos es igual al de los electrones captados, por lo tanto, el balance total de la reacción es igual a cero.

La muestra con peróxido de hidrógeno es diluida y titulada en un medio ácido, usando como titulante permanganato de potasio, provocando la siguiente reacción:



Procedimiento:

1. Colocar 2 mL de la muestra de miel en una concentración de 0.1 g/mL y se afora a 3 mL.
2. Agregar 3.5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) en una concentración 1:5 v/v.
3. Colocar una solución titulante de permanganato de potasio a 0.01 M en una bureta de 10 mL.
4. Anotar la cantidad de solución gastada.

Para preparar la solución de permanganato de potasio, se pesan 0.158 g de éste y se diluyen en 100 mL de agua destilada, hervir ligeramente por un período de 15 a 20 minutos, tapando previamente el matraz que lo contenga con un vidrio de reloj. Se deja enfriar para que el permanganato se precipite y se filtra con papel mojado, nunca seco.

Los datos se interpretan de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$H_2O_2 = VCF$$

Donde:

V=Volumen de la solución valorante en L

C=0.01M

F=Factor de la dilución valorante (2.5)

(Chang, 2007)

Apéndice X Determinación de la presencia de ácido cafeico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Serán utilizados perfiles cromatográficos, en HPLC acoplado a un espectrómetro de masas, equipo de la marca Agilent Technologies modelo 12090 infinity, constituido por una bomba binaria, automuestrador y compartimiento de columnas, haciendo uso de una columna Kinetex 2.6u, C1800A (150X2.1mm) (Phenomenex), una fase móvil de ácido acético 0.25% como fase A y metanol como fase B; iniciando en proporción 50:50, con un flujo de 0.15 mL/min, e iniciando un gradiente de 0 a 65 min hasta llegar a un 100% de B con un flujo de 0.2 mL/min y con un modo de ionización de iones negativos, que usa un fragmentador a 60 volts, gas con una temperatura de 350°C y spray de 9 L/min , y nebulizador a 11 PSI.

El estándar de ácido cafeico se prepara diluyendo 1 mg de éste en 1 mL de metanol grado HPLC. Por otro lado, las muestras se prepararán diluyendo 10 mg de miel en 1 mL de metanol grado HPLC.

Los cromatogramas resultantes de las muestras se solaparán con el resultante del patrón para determinar la presencia del ácido cafeico.

(Gros et al., 1985; Mathews et al., 2002)

Apéndice XI. Método para la determinación de fenoles totales

Los compuestos fenólicos son un grupo ampliamente distribuido en la naturaleza, y de interés humano, pues ejercen un efecto contra enfermedades como el cáncer y desórdenes cardíacos, derivados de su capacidad antioxidante. Estos compuestos poseen una estructura química que les permite captar radicales libres, neutralizando especies reactivas de oxígeno y iones metálicos quelantes (García, 2009).

La concentración de fenoles totales se mide por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, siendo el reactivo de Folin-Ciocalteu el agente oxidante (Oropeza, 2012).

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 al cuadro 11 a las cuales se les agregará el volumen correspondiente de agua para obtener un volumen de 1 mL.

Se toma 1 mL de cada tubo, incluyendo el del problema, y se pasan a otra serie de tubos con 7 mL de agua destilada. A continuación, se adicionan 500 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu. Después de cinco minutos, se añaden 1.5 mL de una solución de Na_2CO_3 (200 g/L) (Cuadro 11).

Para la muestra problema se pesa 1 g de miel y se disuelve en 5 mL de agua destilada para tener una concentración de 200 mg/mL.

Cuadro 11 Concentraciones para preparar curva patrón para la determinación de fenoles totales.

Tubo	Ácido gálico (mg/mL)	Patrón ácido gálico (μ L)	Agua destilada (μ L)	Agua destilada (mL)	Reactivo de Folin-Ciocalteu (μ L)	Na_2CO_3 (mL)
0	--	--	--	7	500	1.5
1	0.00625	31.25	968.75	7	500	1.5
2	0.0125	62.5	937.5	7	500	1.5
3	0.025	125	875	7	500	1.5

4	0.05	250	750	7	500	1.5
5	0.1	500	500	7	500	1.5
6	0.2	1000	0	7	500	1.5
Problema	--	250	750	7	500	1.5

Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente, se mide la absorbancia a 760 nm.

(Método modificado de Singleton et al., 1999)

Apéndice XII. Determinación de flavonoides totales.

En las plantas, los flavonoides sirven como mecanismo de defensa, y son de interés humano pues son usados para tratar enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios y desórdenes cardiovasculares. Pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos y son derivados del benzopirano. 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 (García, 2009).

El contenido de flavonoides totales se determina usando una curva patrón de quercetina (0-100 µg/L) de acuerdo al cuadro 12.

Preparación de la solución STOCK

1 mg de quercetina-1mL de MeOH

Considerando que el volumen total de solución STOCK es 1785 µL, se emplearán 2 mg de quercetina en 2 mL de MeOH.

Para las concentraciones 1 a 4 ppm, hacer lo siguiente:

Del stock de quercetina (2 mg/2mL MeOH), tomar 20 µL que llevarán 20 µg, después, agregar 180 µL de MeOH para conseguir un volumen final de 200 µL. De este nuevo STOCK 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 12. Curva patrón para la cuantificación de flavonoides totales.			
[] ppm	µL STOCK	µL MeOH	(AlCl₃) 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

La concentración de la solución muestra puede variar, dependiendo de las pruebas cualitativas y del criterio del investigador.

Preparación del blanco para la muestra

3 mL 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.

Lectura

Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente. Se determina la absorbancia a 415 nm

Los resultados se expresan como equivalentes de quercetina/g de muestra (eqQ/g) (Ramamoorthy y Bono, 2007)

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

Pesar 1 g de miel y disolver en 5 mL de agua destilada para preparar la solución STOCK. Posteriormente se realiza un gradiente de concentraciones para ver si existe una relación entre la concentración y la actividad antioxidante, de acuerdo al cuadro 13.

Cuadro 13. Concentraciones estándar para determinar la actividad antioxidante de una muestra de miel mediante la reducción del radical DPPH

[ppm]	μL STOCK	μL Agua destilada
20000	100	900
40000	200	800
60000	300	700
80000	400	600
100000	500	500
120000	600	400
140000	700	300
160000	800	200
180000	900	100
200000	1000	0

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 cuya concentración final es de 0.004 g/mL. 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 agua.

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 XIV. Método de difusión en agar.

Método utilizado para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana y antifúngica (levadura)

Medio

El agar Müller-Hinton se utilizará como medio estándar para los ensayos con bacterias, y el agar PDA para los ensayos con levaduras. Es importante que, al momento de preparar las placas, el medio alcance un grosor de 4 mm, de lo contrario, las sustancias antibióticas tendrían a difundirse lateralmente, aumentando las áreas de inhibición, produciendo una lectura errónea de los resultados. Un medio de 4 mm provoca que las sustancias difundan hacia abajo, con tendencia a estrechar las áreas de inhibición.

Inóculo

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 Müller-Hinton en el caso de las bacterias, y caldo Sabouraud para las levaduras. 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.

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.

La sensibilidad de las bacterias se evalúa utilizando sensidiscos impregnados con 25 µg de Cloranfenicol; mientras que la sensibilidad de las levaduras se prueba con Niastina.

Bacterias y levaduras

Es recomendable evitar la presión de CO₂ durante la incubación de las cepas, pues se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida de agar, provocando un descenso de pH, lo que puede inhibir el desarrollo de algunos microorganismos y alterar la actividad de diversos antibióticos.

(Vanden y Vlietnick, 1991; CLSI, 2012)

Referencias bibliográficas

- Aljadi, A.M., Kamaruddin, M.Y., 2004. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chem* 85, 513–518.
- Biruete Guzmán, A., Juárez Hernández, E., Sierio Ortega, E., Romero Viruegas, R., Silencio Barrita, J., 2009. Los nutraceuticos. Lo que es conveniente saber. *Rev. Mex. de Pediatría*. 76(3), 136-145.
- Campbell, M.K., Farrell, S.O., 2010. *Bioquímica*. Cengage Learning, México, D.F.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2012. Performance standars for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. Tech. Rep. M100-S22. Pennsylvania , USA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
- Chang, R., 2007. *Química*, México, McGraw-Hill 7^a.
- Cooper, R., Molan, P., Harding, K., 1999. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus*. *J. of Royal Society of Medicine*. 92, 283-285.
- Córdova-Córdova, C.I.,Ramírez-Arriaga, E., Martínez-Hernández, E., Zaldívar-Cruz, J.M., 2013. Caracterización botánica de miel de abeja (*Apis mellifera*) de cuatro regiones del Estado de Tabasco, México, mediante técnicas mesopalinológicas. *Universidad y Ciencia. Trópico Húmedo*. 29, 163-178
- Delmoro, J., Muñoz, D., Nadal, V., Clementz, A., Pranzertii, V. 2010. El color de los alimentos: determinación de color en mieles. *Universidad del Centro Educativo Latinoamericano*. 25 (13). 145-152
- Doner, L.W., 1977. The Sugars of Honey-A review. *J. Sci. Fd Agric*. 28, 443–456.
- Escuredo, O., Míguez, M., Fernández-González, M., Seijo, M., 2013. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chem* 138, 851–856.

- FAO, FIDA y PMA. 2015. El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo 2015. Cumplimiento de los objetivos internacionales para 2015 en relación con el hambre: balance de los desiguales progresos. Roma, FAO.
- García, A., Vázquez, D., 1998. Cuantificación de proteínas: una revisión. *Bio Tecnología*. 3, 77-88.
- García, N., 2009. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. *Rev. Acad.*6, 1-4.
- Gheldof, N., Wang, X.-H., Engeseth, N., 2002. Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources. *J Agr Food Chem* 50, 5870–5877.
- González, M., Peñalosa, C., 2000. *Biomoléculas (Métodos de análisis)*. Edo. De Méx: Universidad Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
- Gros, E., Pomilio, A., Seldes, A., Burton, G., 1985. *Introducción al estudio de los productos naturales*. Washington D.C.: Programa regional de desarrollo científico y tecnológico.
- Jagota, S., Dani, H., 1982. A New Colorimetric Technique for the Estimation of Vitamin C Using Folin Phenol Reagent. *Anal. Biochem.* 127, 178-182.
- Kalra, E., 2003. Nutraceutical-Definition and Introduction. *AAPS PharmaSci.* 3(5), 1-2.
- Kano, R., Maruyama, H., Kubota, M., Hasegawa, A., Kamata, H., 2011. Chronic ulcerative dermatitis caused by *Fusarium sporotrichioides*. *Med Mycol* 49, 303–305.
- Kwakman, P. H., Zaat, S. A., 2012. Antibacterial components of honey. *IUBMB Life.* 64, 48-55.
- Libonatti, C., Soledad, V., Marina, B., 2014. Antibacterial activity of honey: A review of honey around the world. *J. of Microbiology and Antimicrobials.* 6(3), 51-56.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., 2015. *BROCK. Biología de los microorganismos*. Pearson Educación. Madrid. 14^a.

- Mathews, C., Holde, K., Ahern, K., 2002. Bioquímica. España: Ed. Adisson Wesley. 3ª.
- Natalia, G., Penny, G., Alex, A., Skourtis, S., John, P., Christos, K., 2014. Honey and its Anti-Inflammatory, Anti-Bacterial and Anti-Oxidant Properties. Gen Medicine Open Access 02.
- National Honey Board. 2005. Honey: A Reference Guide to Nature's Sweetener. Firestone, CO.
- Nava-Ramírez, J.E., 2016. Comparación de las propiedades nutraceuticas de dos muestras de miel de *Apis mellifera* L., de diferentes localidades. Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México (Tesis de licenciatura).
- Okusa, P., Penge, O., Devleeschouwer, M., Duez, P., 2007. Direct and indircect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii*. J. Ethnopharmacol. 112, 476-481.
- Oropeza, G., 2012. Alcaloides totales y actividad antioxidante de extractos metanolicos de hojas de *Ipomea murucoides* (casahuate). Tesis. Universidad Tecnológica de la Mixteca. 1-78.
- Pérez U.M., (27 de Junio de 2016). Crece la alerta por desaparición de abejas en varios estados. La Jornada. 35 pp.
- PROFECO, 2001. Calidad de la miel de abeja. Revista del consumidor (287).
- Ramamoorthy, P., Bono, A., 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citriflora* fruit extracts from various extraction processes. JESTEC. 1, 70-80.
- Rodríguez, B., Mendoza, S., Iturriga, M., Castaño-Tostado, E., 2012. Quality Parameters and Antioxidant and Antibacterial Properties of Some Mexican Honeys. J Food Sci 77, C121–C127.
- Ruíz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Zaldivar-Cruz, J., Pérez-Álvarez, J., Kuri, V., 2011. Antioxidant activity of Artisanal Honey From Tabasco, Mexico. Int. J. Food Prop. 459-470.

- Sánchez Nieto, S., 2013. Manual de apoyo para los estudiantes del curso Bioquímica experimental (0141). Facultad de Química. Departamento de bioquímica. UNAM.
- Singleton, V., Orthofer, R., Lamuela-Reventós, R., 1999. Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method. Enzymol.* 152-178.
- Starr, C., Taggart, R., Evers, C., Starr, L., 2009. *Biología. La unidad de la vida.* CENGAGE Learning, México, 12^a.
- Ulloa, J. A., Mondragón Córtez, P. M., Rodríguez Rodríguez, R., Reséndiz Vázquez, J. A., & Rosas Ulloa, P., (Septiembre de 2010). La miel de abeja y su importancia . *Revista Fuente* 4, 11-18.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Zaldivar-Cruz, J., Kuri, V., Fernández-López, J., Carbonell-Barrachina, A., Pérez-Álvarez, J., 2010. Aroma profile and physico-chemical properties of artisanal honey from Tabasco, Mexico. *International JFST.* 45, 1111-1118.
- Vanden, D., Vlietnick, A. 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. *Methods in plant biochemistry* (6), 47-71.
- Wang, H., Bun, T., 2002. Isolation of antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry* 61, 1-6
- Zavala-Olalde, A., Colomo-González, I., Matalí-Pérez, N., Piana, L., Olivier, B., Méndez-Villarreal, A., Vandame, R., 2013. Characterization of four typical honeys from highly diverse tropical ecosystems. *J Apicult Res* 52, 24–34

Sitios web

Bee culture (25 de julio de 2016). *The chemistry of honey*

[Recuperado el 27 de enero de 2017 en:]

(<http://www.beeculture.com/the-chemistry-of-honey/>)

CODEX NORMA DE LA MIEL, 2001 (Codex stan 12-1981 rev.2001)

[Recuperado el 21 de julio de 2016 en:]

<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-standards/es/?ref=STAN>)

FAO. (21 de julio de 2016). *Nutrición*

[Recuperado el 21 de julio de 2016 en:]

<http://www.fao.org/nutrition/es/>)

FAO. *La miel. Un alimento popular*

[Recuperado el 27 de enero de 2017 en:]

<http://www.fao.org/docrep/008/y5110s/y5110s05.htm#TopOfPage>)

INAFED. *Municipio de San Jerónimo Tecoátl, Oaxaca*

[Recuperado el 20 de julio de 2016 en:]

<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM20oaxaca/municipios/20163a.html>)

INAFED. *Municipio de Tenosique, Tabasco*

[Recuperado el 20 de julio de 2016 en:]

<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM27tabasco/municipios/27017a.html>)

INAFED. *Municipio de Texcoco en el Estado de México*

[Recuperado el 20 de julio de 2016 en:]

<http://siglo.inafed.gob.mx/enciclopedia/EMM15mexico/municipios/15099a.html>)

National Honey Board. *How honey is made.*

[Recuperado el 27 de enero de 2017 en:]

<https://www.honey.com/honey-at-home/learn-about-honey/how-honey-is-made>)

Norma Oficial Mexicana (NMX-F-036-1997)

[Recuperado el 2 de noviembre de 2016 en:]

<http://www.anmvea.com/imagenes/normas/NMX-F-036-1997.pdf>

<http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-036-1981.PDF>

OMS (30 de abril de 2014) *El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo.*

[Recuperado el 20 de julio de 2016 en:]

<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>

OMS (21 de julio de 2016). *Temas de Salud.*

[Recuperado el 21 de julio de 2016 en:]

<http://www.who.int/topics/nutrition/es/>

SAGARPA (27 de octubre de 2011). *Producción de miel*

[Recuperado el 21 de julio de 2016 en:]

<http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/sanluispotosi/boletines/Paginas/BOL271011.aspx>