



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS
LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA**

**Evaluación de la actividad cicatrizante de miel de la abeja sin
aguijón *Scaptotrigona mexicana* Guérin-Meneville (Meliponini)**

TESINA



Que para obtener el título de
BIÓLOGA

Presenta:
Ramírez González Abigail

Directora de tesina:
Dra. María Margarita Canales Martínez



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. 2021



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

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

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

Su revisión se llevó a cabo por el siguiente jurado:

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Dra. Ana Bertha Hernández Hernández

Dra. María Margarita Canales Martínez

Dra. Judith Salas Oropeza

M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla

Para su ejecución se contó con el apoyo de:

Financiamiento UNAM PAPIIT IN205020

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad por brindarme la oportunidad de formarme.

A todos mis profesores que me han apoyado en este proceso.

A mi directora de tesis por su apoyo incondicional, por motivarme y enseñarme que, a pesar de las adversidades, siempre debemos de salir adelante.

A mi compañero de laboratorio, Gabriel, por mantenernos unidos a lo largo de esta epidemia por Covid-19, trabajando en conjunto aprendiendo uno del otro siempre.

A mis amigos, Diana, Alejandro, Fernanda y Sergio, gracias por acompañarme a lo largo de esta etapa, por enseñarme distintos aspectos, no solo académicos, sino aspectos que me servirán a lo largo de toda mi vida.

A mi mejor amiga Paz, te agradezco por cada momento que hemos vivido juntas, porque me escuchas y aconsejas y sé que siempre podré confiar en ti.

A la familia Silva Rivera por brindarme trabajo durante mis estudios, por ser tan flexibles y atentos hacia mi persona.

A mi tía Pascuala, por su apoyo incondicional, por preocuparse por mí y por mi familia.

DEDICATORIAS

A mi madre, agradezco de todo corazón tu apoyo, amor y paciencia incondicional desde el momento en que tome la decisión de convertirme en bióloga. Jamás podre igualar el sacrificio que has hecho por mí. Sin duda alguna, este objetivo nunca se lograría si no es por ti. Te amo.

	ÍNDICE DE CONTENIDO	i
Índice de cuadros		ii
Índice de figuras		ii
Resumen		iii
1. Introducción		1
2. Antecedentes		7
3. Planteamiento del problema		8
4. Hipótesis		8
5. Objetivos		9
6. Material y métodos		11
Obtención de la muestra		11
Propiedades organolépticas		11
➤ Color		11
➤ Sabor y olor		12
➤ Viscosidad		12
Caracterización química de la miel		13
➤ pH		13
➤ Densidad		13
➤ Humedad		13
➤ Ácidos orgánicos		14
➤ Carbohidratos		14
➤ Proteínas		15
➤ Ácido ascórbico		16
➤ Fenoles y flavonoides		17
Capacidad antioxidante		19

Detección de esporas de hongos	20
Bioensayos	21
Evaluación cicatrizante	23
➤ Fuerza de cierre de la herida	23
➤ Velocidad de cierre de la herida	23
➤ Histología	24
7. Resultados	25
8. Conclusión	31
9. Aportaciones y trascendencia	32
Apéndice I	33
Apéndice II	34
Apéndice III	35
Apéndice IV	36
Apéndice V	37
Apéndice VI	37
Apéndice VII	38
Apéndice VIII	39
Apéndice IX	41
Bibliografía citada	43

ÍNDICE DE CUADROS

ii

Cuadro 1	Especies de Meliponinos endémicas de México y su distribución	5
Cuadro 2	Determinación de color de acuerdo con la escala Pfund	12
Cuadro 3	Bacterias que se utilizarán en los bioensayos	22
Cuadro 4	Hongos y levaduras que se utilizarán en los bioensayos	22
Cuadro 5	Estándares de calidad para las mieles de <i>Scaptotrigona</i>	28
Cuadro 6	Curva patrón para la cuantificación de carbohidratos	34
Cuadro 7	Curva patrón para la cuantificación de proteínas	35
Cuadro 8	Curva patrón para ácido ascórbico	36

ÍNDICE DE FIGURAS

ii

Figura 1	Capas que constituyen la piel	1
Figura 2	Esquema de la epidermis y dermis	1
Figura 3	Secuencia de eventos después de una herida en la piel por incisión	3
Figura 4	Esquemmatización de la metodología	10
Figura 5	Estructura química del disacárido sacarosa	15
Figura 6	Estructura química de la vitamina C	16
Figura 7	Estructura molecular general de un fenol	17
Figura 8	Estructura molecular general de un flavonoide	17
Figura 9	Reacción de reducción del radical DPPH•	20
Figura 10	Propiedades de la miel que están involucradas en la cicatrización	32

Resumen

La piel es un órgano extraordinario que cubre casi la totalidad de la superficie corporal. Desempeña diversas funciones como la termorregulación, detección de estímulos sensoriales, adsorción de radiaciones ultravioleta, defensa inmunológica y protección frente a agresiones externas o contra microorganismos patógenos. La frecuente exposición a las agresiones del entorno hace que este órgano sea susceptible a sufrir lesiones que comprometan su integridad, la mayoría de estas son las heridas, las cuales se definen como la pérdida de la continuidad de la piel o mucosa producida por algún agente físico o químico.

Al proceso de curación de heridas se conoce como cicatrización, y consiste en un conjunto de procesos biológicos para recuperar la integridad y arquitectura del tejido. Sin embargo, las heridas son susceptibles a infecciones debido a agentes patógenos externos, esto es de suma importancia ya que la carga bacteriana puede interferir en el proceso de cicatrización.

Los beneficios de diversas sustancias naturales han sido utilizados por el hombre a lo largo de miles de años para combatir infecciones por heridas y mejorar la cicatrización. La miel presenta un conjunto de propiedades importantes que mejoran este proceso, ya que se le ha atribuido efectos antibacterianos, actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiedematosa y exudativa que reduce rápidamente el dolor, estimula la formación de tejido de granulación sano, también favorece el cierre de heridas y reduce al mínimo la apariencia de cicatrices.

Los reportes curativos o fisicoquímicos de la miel se concentran en la de la abeja europea *Apis mellifera* debido a que se produce en casi todos los países del mundo. En cambio, existe escaso conocimiento acerca de la miel de abejas sin aguijón, a pesar de que se han utilizado principalmente con fines medicinales por culturas indígenas en diversas regiones tropicales y subtropicales del planeta. Además, no hay un control de calidad de la miel de abejas sin aguijón dirigida a los consumidores. Por lo antes mencionado, en esta tesina se investigó sobre las técnicas que se pueden llevar a cabo para determinar si la miel es de buena calidad y eficaz para la cicatrización de heridas en un modelo murino, consultando artículos científicos y tesis de diferentes grados académicos.

Palabras clave: *miel, Scaptotrigona mexicana, abejas sin aguijón, cicatrización, heridas, propiedades medicinales.*

1. Introducción

1.1 La piel: composición y función

La piel es un órgano extraordinario que cubre casi la totalidad de la superficie corporal. Se caracteriza principalmente porque es elástica, se regenera por sí misma y es casi totalmente permeable (Esteva, 2006).

Se constituye de diferentes capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis (Figura 1). La epidermis es la capa más externa, consta de 4 tipos celulares: queratinocitos, melanocitos, células de Merkel y células de Langerhans; además presenta 4 capas diferenciadas: capa basal, capa espinosa, capa granulosa y capa córnea (Figura 2) (Puig, 2014).

La segunda capa, la dermis, representa la mayor proporción de la piel y es el verdadero soporte de este órgano, formada por componentes fibrosos: colágeno y fibras elásticas, y la sustancia fundamental (glucosaminoglucanos/proteoglucanos) (Figura 2). En ella se encuentran los principales anexos cutáneos como el pelo, uñas, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas. Finalmente, la hipodermis, es la capa más profunda de la piel y está formada por gran cantidad de células que contienen grasa, llamadas adipocitos (Esteva, 2006).

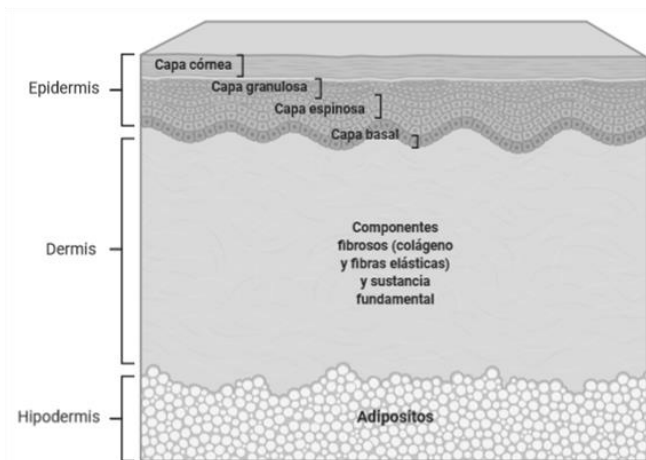


Figura 1. Capas que constituyen la piel, creado en BioRender.com

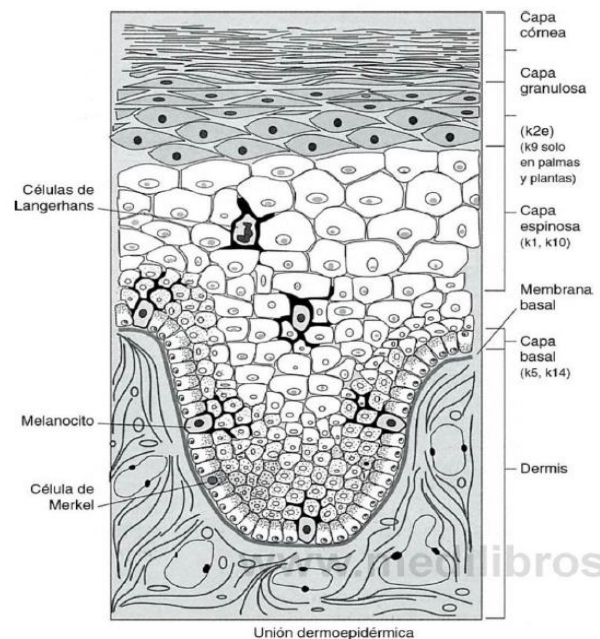


Figura 2. Esquema de la epidermis y dermis, donde k= queratina. Tomado de Puig (2014)

La piel desempeña diversas funciones como pueden ser la termorregulación, secreción, detección de estímulos sensoriales, adsorción de radiaciones ultravioleta, producción de vitamina D, defensa inmunológica, protección frente a agresiones externas o contra microorganismos patógenos (Esteva, 2006; Puig, 2014). No obstante, la frecuente exposición a las agresiones del entorno hace que este órgano sea susceptible a sufrir lesiones que comprometan su integridad, generándose una herida (Guarín *et al.*, 2013). De acuerdo con lo anterior, Salem *et al.* 2000, definen “herida” como la pérdida de la continuidad de la piel o mucosa producida por algún agente físico o químico.

1.2 Heridas y cicatrización

Las heridas pueden clasificarse en función del tiempo de evolución: heridas agudas (corto tiempo de evolución) y heridas crónicas (estas persisten durante un periodo prolongado). Las heridas agudas se caracterizan por su curación completa en un tiempo previsto y por no presentar complicaciones, por ejemplo: heridas cortantes, contusas, punzantes, raspaduras, avulsivas, magulladuras o quemaduras. Mientras que las heridas crónicas se caracterizan por retrasarse durante el tiempo de curación y por la ausencia del crecimiento de los tejidos, además se asocian a una excesiva inflamación y pobre perfusión de oxígeno, por ejemplo: úlceras por presión, úlceras vasculares, úlceras neoplásicas, entre otras (Salem *et al.*, 2000; Esteva, 2006).

Al proceso de curación de heridas se conoce como cicatrización, y consiste en un conjunto de procesos biológicos para recuperar la integridad y arquitectura del tejido afectado. Involucra 3 fases (Salem *et al.*, 2000, Guarín *et al.*, 2013):

- 1) Fase inflamatoria: se caracteriza por presentar una respuesta vascular y celular formándose una costra que sella la herida. Durante este periodo, el tejido no recupera la fuerza de tensión y depende únicamente del material de sutura para mantener su fijación.
- 2) Fase de proliferación: aparecen los fibroblastos que van a formar el tejido de granulación, ocurre recanalización de los vasos linfáticos y se forman capilares sanguíneos.

3) Fase de maduración: se logra la cicatrización completa. El principal evento fisiológico es la epitelización y el aumento progresivo de la fuerza tensil de la piel.

La figura 3 representa el proceso de cicatrización a través del tiempo cuando un agente externo genera una lesión por incisión desencadenando las fases antes mencionadas sobre la piel. En el inciso a, la sangre que salió de los vasos coagula y formará un tapón temporal o costra (0-12 horas). Mientras que, en b, las células epidérmicas se dividen para cubrir la pérdida, además los macrófagos destruyen y eliminan el tejido dañado y los miofibroblastos desarrollan la capacidad de contracción de la herida (12 horas-4 días). En c, la cavidad de la herida es cubierta con nueva epidermis, cuando hay daño significativo de la dermis, se forma una cicatriz, este proceso puede durar de 4 a 10 días (Marks y Motley, 2012).

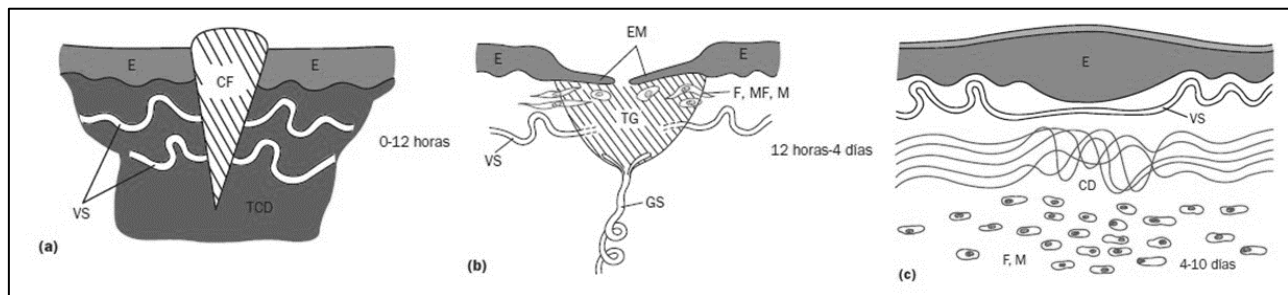


Figura 3. Esquema de la secuencia de eventos después de una herida de piel por incisión. Donde: **E**= epidermis; **TCD**= tejido conectivo dérmico; **VS**= vaso sanguíneo; **CF**= coágulo de fibrina; **EM**= epidermis migratoria; **F**= fibroblastos; **MF**= miofibroblastos; **M**= macrófagos; **TG**= tejido granuloso; **GS**= glándula sudorípara; **CD**= colágeno dérmico. Tomado de Marks y Motley (2012).

Cabe mencionar que las heridas pueden ser susceptibles a infectarse debido a agentes patógenos externos, esto es de suma importancia ya que la carga bacteriana que se encuentre en las heridas puede interferir en el proceso de cicatrización (Mengarelli *et al.*, 2013). Sin embargo, para evitarlo se emplean diversos antisépticos.

En el mercado existen diferentes tipos con propiedades y mecanismos de acción bien diferenciados, por ejemplo, el alcohol etílico (C_2H_5OH) 70°, puede eliminar bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y virus, pero es un producto inflamable, puede causar irritación y no se recomienda aplicar en heridas abiertas. Por otro lado, la povidona yodada ($C_6H_9I_2NO$) puede eliminar los mismos microorganismos que el alcohol además de hongos, sin embargo, retrasa el crecimiento del tejido de granulación y no está recomendada

durante el embarazo, ni en neonatos, lactantes o personas con alteraciones tiroidales (Esteva, 2006). Asimismo, no es recomendable el uso de antisépticos en heridas crónicas (Mengarelli *et al.*, 2013).

1.3 Uso de miel en la medicina tradicional

A pesar de lo mencionado anteriormente, los beneficios de diversas sustancias naturales han sido utilizados por el hombre a lo largo de miles de años para combatir infecciones por heridas y mejorar la cicatrización. Por ejemplo, la miel ha sido utilizada desde la antigüedad por su alto valor nutritivo empleándose en la medicina tradicional (Cauch *et al.*, 2015).

Biológicamente entendemos por miel a “la sustancia producida por las abejas y otros insectos sociales, a partir del néctar o melazas que ellos recolectan sobre plantas vivas y que transforman o elaboran mediante evaporación de agua y acción de enzimas, segregadas por ellos, quedando almacenada en los alveolos o celdillas de los panales” (Cauch *et al.*, 2015). Las propiedades y composición de la miel de abeja dependen del origen floral geográfico, temporalidad, factores ambientales y del manejo para su provecho (Contreras-Oliva *et al.*, 2018).

Schencke *et al.* 2016, mencionan que la miel presenta un conjunto de propiedades importantes que contribuyen en el proceso de cicatrización de heridas, ya que se ha atribuido que la miel presenta efecto antibacteriano, actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiedematosa y exudativa que reduce rápidamente el dolor, estimula la formación de tejido de granulación sano, también favorece el cierre de heridas y reduce al mínimo la apariencia de cicatrices. Además, mencionan que la miel puede ser clasificada como una sustancia no tóxica y puede ser aplicada con seguridad como un vendaje sobre las heridas.

1.4 Abeja europea y abejas sin aguijón

Los reportes curativos o fisicoquímicos de la miel se concentran en la de la abeja europea *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, debido a que se produce en casi todos los países del mundo (Cauch *et al.*, 2015). En cambio, existe escaso conocimiento acerca de la miel de abejas

sin aguijón, aunque se ha utilizado principalmente con fines medicinales por culturas indígenas en diversas regiones tropicales y subtropicales del planeta (Moo *et al.*, 2015).

Ambos grupos de abejas pertenecen a la familia Apidae, orden Hymenoptera, y se diferencian al nivel de subfamilia: Apinae para las abejas mieleras y Meloponinae para las abejas sin aguijón. Son muchas las principales características que distinguen a estas abejas, una de ellas es la forma de construcción de sus colmenas, además del aguijón atrofiado presente en Meloponinae (Vit *et al.*, 2004).

Existen entre 400 y 500 especies en el mundo dentro de Meloponinae (tribu Meliponini), nativas del Nuevo Mundo. En México se han descrito un total de 18 géneros y 46 especies, de las cuales 20 se encuentran bajo alguna forma de manejo (Reyes-González *et al.*, 2016) y 13 son endémicas. Los géneros *Plebeia*, *Trigona*, *Melipona* y *Trigonisca* son los más diversos en el país. Además, la Costa del Pacífico de Guerrero a Chiapas, y el sur de Veracruz, son las áreas que contienen el mayor número de especies de abejas sin aguijón (Cuadro 1) (Ayala *et al.*, 2012).

Cuadro 1. Especies endémicas de México y su distribución de acuerdo con Ayala *et al.* 2012.

Especies	Descriptor	Distribución
<i>Cephalotrigona eburneiventris</i>	Schwarz, 1948	Colima, Guerrero, Michoacán, Morelos, Puebla
<i>Cephalotrigona oaxacana</i>	Ayala, 1999	Oaxaca
<i>Lestrimelitta chamalensis</i>	Ayala, 1999	Colima, Jalisco, Guerrero, Nayarit
<i>Melipona colimana</i>	Ayala, 1999	Colima, Jalisco
<i>Melipona fascinata</i>	Latreille, 1811	Estado de México, Michoacán, Guerrero, Morelos, Oaxaca, Veracruz
<i>Melipona lupitae</i>	Ayala, 1999	Michoacán
<i>Plebeia cora</i>	Ayala, 1999	Zacatecas, Sinaloa
<i>Plebeia fulvopilosa</i>	Ayala, 1999	Guerrero
<i>Plebeia manantlensis</i>	Ayala, 1999	Colima, Jalisco
<i>Plebeia mexicana</i>	Ayala, 1999	No se tiene registro

<i>Scaptotrigona hellwegeri</i>	Friese, 1900	Colima, Durango, Estado de México, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Chiapas
<i>Trigonisca azteca</i>	Ayala, 1999	Guerrero, Estado de México, Morelos, Puebla
<i>Trigonisca mixteca</i>	Ayala, 1999	Chiapas, Oaxaca

La cría de abejas sin aguijón en el país se da en diferentes regiones, pero su cultivo ha sobrevivido principalmente en la península de Yucatán, la sierra nororiental de Puebla y la región totonaca de Veracruz, donde se crían principalmente las especies *Melipona beecheii* y *Scaptotrigona mexicana* (Alquisira, 2019).

Scaptotrigona mexicana es nativa de México, Guatemala, El Salvador y Costa Rica (Contreras-Oliva *et al.*, 2018). Es una abeja pequeña de color negro, que construye sus nidos en los troncos o ramas huecas de los árboles, además su nido se caracteriza por tener una entrada en forma de trompeta que resguardan abejas guardianas. Cabe destacar que esta especie ha mostrado un alto potencial comercial, asimismo la miel, polen, propóleo y cerumen tiene un alto valor cultural, nutrimental y medicinal (Salazar-Vargas *et al.*, 2017).

1.5 Meliponicultura y medicina tradicional

La actividad dedicada para la crianza y aprovechamiento de abejas sin aguijón se conoce como meliponicultura (Moo *et al.*, 2015). En México la miel es utilizada principalmente como un suplemento medicinal y para el tratamiento de infecciones oculares, fracturas, dolor muscular, esguinces, heridas cutáneas, entre otras afecciones. Cabe agregar que la práctica tradicional de meliponicultura es importante en distintos lugares del país, como en la península de Yucatán (Mayas), la Sierra Norte de Puebla por los Nahuas y Totonacos, en el sur de Veracruz por los Popolucas y en el istmo de Tehuantepec por los Zapotecos, Mixes y Zoques (Reyes *et al.*, 2016).

Actualmente, hay escaso conocimiento sobre los productos, manejos o cuidados de los meliponinos, además que no se encuentran incluidos en las normas internacionales para la

miel, es decir, no hay un control de calidad de la miel de abejas sin aguijón dirigida a los consumidores (Moo *et al.*, 2015). A pesar de lo anterior, actualmente ha incrementado el interés por la producción de meliponinos dado a diversas ventajas, entre ellas, los productos obtenidos pueden ser comercializados a un precio más elevado que el de *A. mellifera* y es fácil el manejo de las abejas dada a su docilidad y carencia de aguijón (Márquez, 1994).

Tal como se menciona, la miel de meliponinos ha cumplido un papel importante en la medicina tradicional en distintos pueblos indígenas, actualmente la medicina moderna retoma su estudio debido a las distintas propiedades que favorecen la recuperación de heridas y que su uso ofrece un tratamiento natural alternativo bastante eficaz en la población mundial que reduce el costo de los tratamientos modernos (Schencke *et al.*, 2016).

2. Antecedentes

2.1 Uso de la miel de abejas sin aguijón en México

En México se ha reportado el uso medicinal de la miel de Meliponini en diferentes grupos indígenas como antiséptico o antiinflamatorio, y en padecimientos como asma, tos, problemas oculares, desórdenes digestivos, dolor muscular, úlceras en la boca, erupciones en la piel, heridas cutáneas, entre otros (Tabasco: Vásquez y Hipólito, 2011, Cano-Contreras *et al.*, 2013; Michoacán: Reyes *et al.*, 2014; Revisión: Cauich *et al.*, 2015; Michoacán: Reyes *et al.*, 2016; Yucatán: Canul-Heredia *et al.*, 2017).

2.2 Propiedades organolépticas y fisicoquímicas de mieles de abejas sin aguijón

Se han descrito las propiedades organolépticas, las características fisicoquímicas, los compuestos bioactivos y el origen botánico de distintas mieles (Guatemala, México y Venezuela: Vit *et al.*, 2004; Yucatán: Catzín *et al.*, 2009; Revisión: Moo *et al.*, 2015, Visweswara *et al.*, 2016 y Ávila *et al.*, 2018). En cuanto a la miel producida por *S. mexicana* se han reportado algunas propiedades fisicoquímicas de su miel (Guatemala: Dardón y Enríquez, 2008; México: Jiménez *et al.*, 2016; Chiapas: Espinoza-Toledo *et al.*, 2018; Puebla: Jiménez-Díaz, 2019) y polen (Veracruz: Contreras-Oliva *et al.*, 2018).

2.3 Actividad antimicrobiana, antioxidante o antiinflamatoria de la miel de abejas sin aguijón

Se afirma la actividad antimicrobiana, antioxidante o antiinflamatoria de la miel de distintas especies de meliponios (Yucatán: Catzín *et al.*, 2009, Chan *et al.*, 2012; Revisión: Cauich *et al.*, 2015; Yucatán: Ruíz-Ruíz *et al.*, 2017; Chiapas: Grajales-Conesa *et al.*, 2018) entre ellos *S. mexicana* (Guatemala: Dardón y Enríquez, 2008; Chiapas: Kimoto-Nira y Amano, 2008; México: Jiménez *et al.*, 2016; Chiapas: Grajales-Conesa *et al.*, 2018).

2.4 Mecanismos de acción de la miel de meliponinos para su uso en curación de heridas

Asimismo, se han definido las distintas características y mecanismos de acción de la miel de meliponinos para su uso en curación de heridas, así como el estudio de su efecto cicatrizante (Brasil: Alves *et al.*, 2008, Medeiros *et al.*, 2016; Revisión: Abd *et al.*, 2017; Guatemala: Nufio-Oliva, 2018; Revisión: Nordin *et al.*, 2018).

3. Planteamiento del problema

¿La miel de la abeja sin aguijón *S. mexicana* (Meliponini) tendrá actividad cicatrizante utilizando un modelo murino de la especie *Mus musculus*?

4. Hipótesis

Si la miel de abejas sin aguijón (Meliponini) presenta actividad antimicrobiana, además se ha reportado que presenta otras propiedades como capacidad antioxidante y antiinflamatoria y es utilizada en la medicina tradicional para curar heridas o úlceras cutáneas, entonces la miel de la especie *S. mexicana* debe contener compuestos biológicos con propiedades cicatrizantes, por lo que la miel potenciará el efecto cicatrizante en heridas.

5. Objetivos

5.1 General

Determinar la actividad cicatrizante de miel de la abeja sin aguijón *Scaptotrigona mexicana* (Meliponini).

5.2 Particulares

De una muestra obtenida a partir de *S. mexicana*:

- Determinar las propiedades organolépticas: color, sabor, olor, viscosidad.
- Determinar las características químicas: pH, densidad, humedad, ácidos orgánicos, carbohidratos, proteínas, ácido ascórbico, fenoles y flavonoides.
- Determinar la capacidad antioxidante.
- Determinar la presencia de esporas de hongos.
- Corroborar la actividad antimicrobiana.
- Evaluar la fuerza de cierre de una herida.
- Evaluar la velocidad de cierre de una herida.
- Evaluar la actividad cicatrizante a nivel histológico.

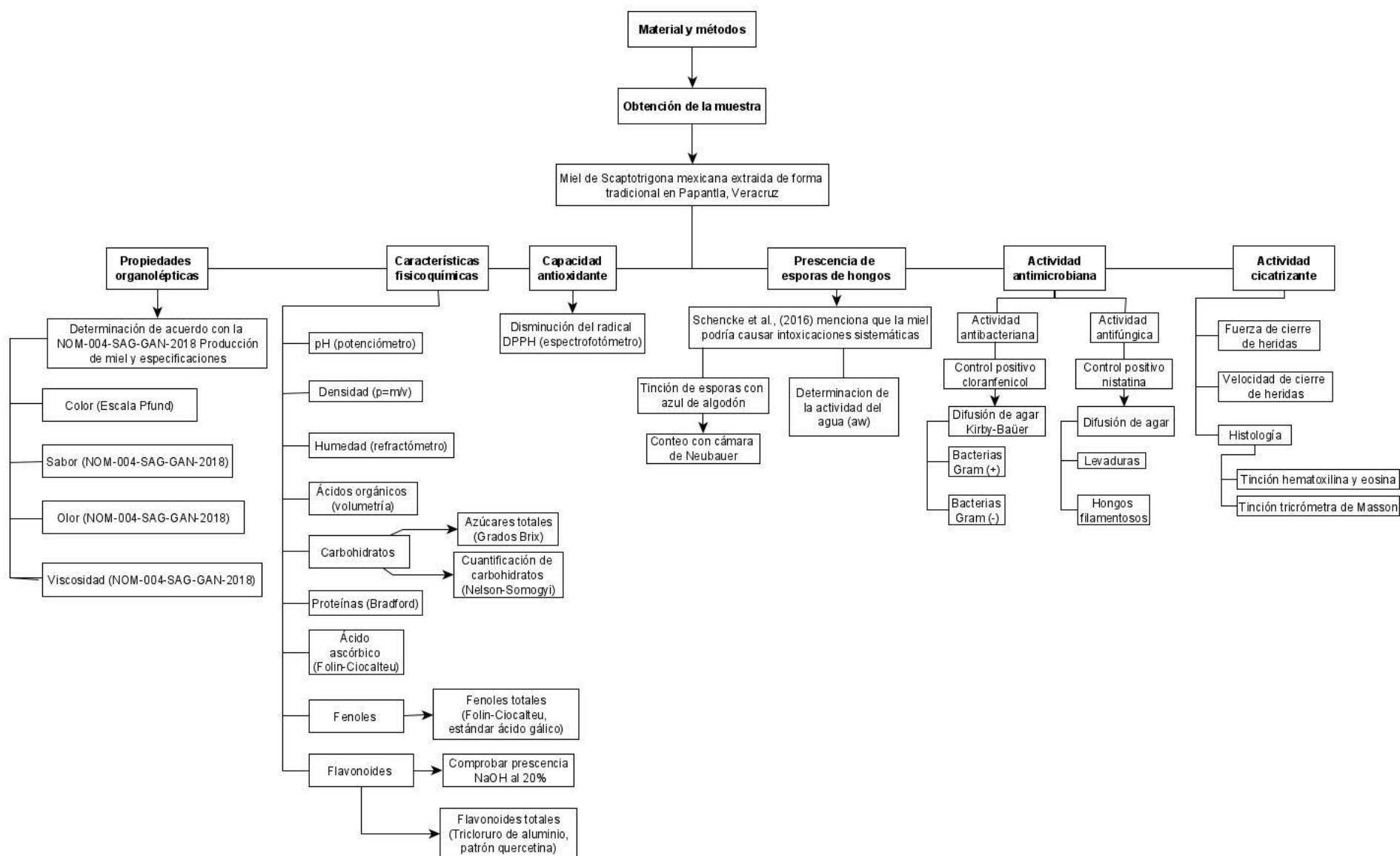


Figura 4. Esquematización de la metodología para la evaluación del efecto cicatrizante de miel de meliponinos

6. Material y métodos

Visualización general de la metodología representada en figura 4.

6.1 Obtención de la muestra

La miel virgen de *S. mexicana* se puede obtener de forma tradicional en el Apiario Comunitario de Papantla, Veracruz. Este municipio está ubicado en la zona norte del Estado, en la sierra Papanteca. Ocupa una extensión territorial de 1, 291.06 Km² y la altitud promedio es de 200 m.s.n.m. Además, la vegetación natural está representada principalmente por selva alta perennifolia (INEGI, 1989). Geográficamente el apiario se encuentra en la localidad de Gildardo Muñoz, las coordenadas son 20° 23' 42.7" Norte y 97° 23' 31.2" Oeste.

6.2 Propiedades organolépticas

En México, la norma NOM-004-SAG-GAN-2018 Producción de miel y especificaciones (DOF, 2020), establece estándares de calidad para que la miel de *A. mellifera* sea segura para su consumo. Por ende, es importante garantizar la calidad y seguridad de los productos que se comercializan por medio de análisis físicos y químicos.

Uno de los primeros análisis físicos que se llevan a cabo son de las propiedades organolépticas, es decir, todas aquellas descripciones de las características físicas que pueden percibir los sentidos, como pueden ser el color, sabor, aroma y la textura.

La descripción de las características físicas sensoriales de la miel de meliponinos, es un indicador importante de su calidad, además la cotización de una miel en el mercado internacional está determinada en gran parte con base en su color, sabor y densidad (Cauch *et al.*, 2015).

➤ **Color**

El color se determina con un colorímetro HANNA utilizando glicerina para calibrar, posteriormente se coloca la muestra directamente en el lente. Los resultados se expresan generalmente en mmPf para compararlos con la escala (Cuadro 2).

Cuadro 2. Determinación del color de acuerdo con la graduación Pfund

Color	Graduación en mm
Blanco agua	0 - 8
Extra blanco	9 - 16
Blanco	17 – 34
Ámbar extra claro	35 - 50
Ámbar claro	51 - 84
Ámbar	85 – 114
Obscuro	115 - 140

El sabor, olor y viscosidad se determinan de acuerdo con la norma NOM-004-SAG-GAN-2018 Producción de miel y especificaciones (DOF, 2020), donde la muestra de miel de *S. mexicana* será preparada de la siguiente manera: se colocan 30 o 40 g en un vaso de cristal con una capacidad total de 130 ml aproximadamente, con tapa, y la temperatura debe mantenerse entre los 18 y 25° C. Las evaluaciones deben realizarse dentro de las 24 h posteriores a la preparación de la muestra.

➤ **Sabor y olor**

Para la determinación del sabor, se toman de 1 a 2 g de la muestra con una cuchara desechable o de acero inoxidable, posteriormente se dejará que la miel se disuelva en la boca antes de ser tragada para poder percibir el sabor, la persistencia, cualquier sabor posterior u otras sensaciones en la boca. Esto se hace por duplicado, esperando que transcurran al menos dos minutos entre las ingestas.

Para la determinación del olor se extiende la muestra sobre la superficie de un vaso de cristal con ayuda de un agitador de vidrio, para la liberación de sustancias volátiles, evaluando inmediatamente después de 10 a 20 segundos. Este procedimiento se realiza por duplicado, esperando 20 segundos como mínimo para percibir todo el olor.

➤ **Viscosidad**

La miel en estado líquido suele ser muy viscosa, ya que esta propiedad depende de su composición química, contenido de agua y temperatura. Una baja viscosidad en la miel

puede ser un indicador de adulteración por adición de agua (Suescún y Vit, 2008). La norma NOM-004-SAG/GAN-2018 (DOF, 2020) menciona que la consistencia debe de ser fluida, viscosa, total o parcialmente cristalizada.

6.3 Caracterización fisicoquímica de la miel

La composición química de la miel está fuertemente asociada con la fuente botánica visitada por las abejas, el área geográfica, las condiciones regionales y climáticas (Cauich *et al.*, 2015), las especies de abejas que estén involucradas en su producción y las condiciones de su almacenamiento. Sin embargo, cuando se comparan los estándares de calidad relacionados con la miel de *A. mellifera*, la miel de abejas sin aguijón expresa diferencias significativas (Ávila *et al.*, 2018).

➤ **pH**

El pH es la concentración de hidrógenos de una solución. Para determinarlo, se pesan 10 g de miel y se colocan en 75 ml de agua destilada. En general se emplea un potenciómetro (pHT estr 30) para la determinación del pH colocándolo directamente en la muestra preparada.

➤ **Densidad**

La densidad de las muestras de miel puede ser bajas y altas. Sin embargo, si la miel presenta un valor de alta densidad, la miel es descrita como de buena calidad (Lullah-Deh *et al.*, 2018). Para conocer la densidad de la miel de *S. mexicana*, se puede utilizar la fórmula $\rho = \frac{m}{v}$ donde se coloca 1 ml de miel en un frasco vial y se pesa en una balanza analítica.

➤ **Humedad**

La humedad de la miel es un criterio de calidad que determina su capacidad para permanecer estable y resistir el deterioro por la fermentación de levaduras. Cuanto mayor es la humedad, mayor es la probabilidad de que la miel fermente durante su almacenamiento (Bogdanov *et al.*, 2002). Cabe mencionar que, el contenido de agua afecta muchas de sus características como la viscosidad, peso específico, maduración, sabor y

cristalización (Suescún y Vit, 2008). Para determinar este criterio, se emplea un refractómetro ATAGO PAL 225 colocando la muestra directamente en la lente.

➤ **Ácidos orgánicos**

El valor de la acidez (número de hidrógenos presentes en una sustancia en forma de ácido fijo o volátil), corresponde a el balance de los ácidos orgánicos presentes en la miel, los cuales varían acordando a la composición floral y las especies de abeja. Este valor también es influenciado por la fermentación de los azúcares a alcohol por microorganismos, además de la oxidación de ácidos carboxílicos (Ávila *et al.*, 2018). Los ácidos orgánicos son los responsables del pH bajo de la miel y de su estabilidad. En la miel se distinguen tres tipos de acidez: libre, láctica y total (Díaz y Fernández, 1998).

La acidez libre valora principalmente los ácidos orgánicos libres presentes en la miel. El más importante es el glucónico, que se forma a partir de la glucosa por acción de la enzima D – glucosa oxidasa. El resto de los ácidos orgánicos pueden ser de origen animal (ácido fórmico) o provenientes de las plantas (ácido cítrico, málico, oxálico o succínico) (Díaz y Fernández, 1998).

La NOM-004-SAG-GAN-2018 Producción de miel y especificaciones, establece el método volumétrico para la determinación de ácidos orgánicos presentes, el cual puede utilizarse para la miel de *S. mexicana*. Este método se basa en el proceso de neutralización de un ácido mediante un hidróxido en presencia de fenolftaleína como indicador (DOF, 2020). El procedimiento se encuentra descrito en el apéndice I.

➤ **Carbohidratos**

Los azúcares son el principal constituyente de la miel, los cuales están comprendidos cerca del 95% en peso seco. Los azúcares principales son los monosacáridos hexosas como la fructuosa y glucosa, los cuales son productos de la hidrólisis del disacárido sacarosa (Figura 5) (Bogdanov, 2016). Los carbohidratos de la miel son analizados para obtener información sobre diferentes aspectos de su calidad, de esta forma se tiene la determinación de azúcares reductores (glucosa y fructuosa), de sacarosa y azúcares totales (Bogdanov *et al.*, 2002).

Los azúcares totales de la miel de *S. mexicana* se logran determinar por medio de Grados Brix colocando 3 ml de miel directamente en un refractómetro ATAGO RePo-4. Este método se basa en la medición de densidad aparente, dada por la concentración de sólidos disueltos y en suspensión en la miel, empleando un refractómetro con escala en grados Brix y calibrado a 20° C. Los Grados Brix representan el porcentaje en peso de los sólidos disueltos en solución (Suárez-Moreno, 2003).

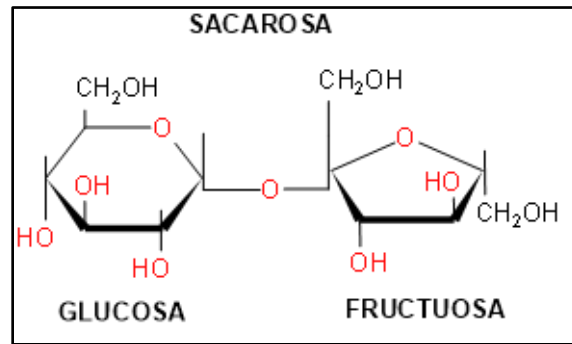


Figura 5. Estructura química del disacárido sacarosa

Para la cuantificación de carbohidratos reductores, se emplea el método de Nelson-Somogyi. El principio de esta técnica consiste en lo siguiente: cuando se calientan los azúcares reductores con tartrato de cobre alcalino, reducen el cobre del estado cúprico a cuproso y así se forma óxido cuproso. Cuando el óxido cuproso se trata con ácido arsenomolibdico, se produce la reducción del ácido molibdico a azul de molibdeno. El color azul resultante se compara con un conjunto de estándares en un colorímetro a 540 nm (Sadasivam y Manickam, 1996). El método se realiza de acuerdo con el apéndice II.

➤ **Proteínas**

La miel contiene aproximadamente 0.5% de proteínas, principalmente como enzimas y aminoácidos. Los niveles de aminoácidos y proteínas en la miel son el reflejo del contenido de nitrógeno, el cual es variable. Entre el 40-80% del nitrógeno total de la miel es proteína (Cauich *et al.*, 2015). Dentro de las sustancias mandibulares de las abejas, como las enzimas y las proteínas que se añaden al néctar durante el transporte de la colmena, también pueden cambiar el pH de la miel. Además, las proteínas presentes cumplen un papel importante en respuestas antiinflamatorias y antioxidantes (Ávila *et al.*, 2018).

Para cuantificar las proteínas presentes en la miel de *S. mexicana*, se empleará el método de Bradford. Esta técnica es bastante precisa y las muestras que están fuera de rango se

pueden volver a analizar en minutos. Está basada en la observación de la máxima absorbancia de una solución ácida de azul brillante de Coomassie, que cambia de 465 nm a 595 nm cuando se produce la unión del colorante a las proteínas. Tanto las interacciones hidrófobas como las iónicas estabilizan la forma aniónica del tinte, provocando un cambio de color visible (Caprette, 2015). El procedimiento que se realizará para cuantificar las proteínas se encuentra descrito en el apéndice III.

➤ **Ácido ascórbico**

Entre las vitaminas comúnmente encontradas en la miel están la riboflavina (vitamina B2), ácido pantoténico (vitamina B5), niacina (vitamina B3), tiamina (vitamina B1), piridoxina (vitamina B6) y ácido ascórbico (vitamina C). La vitamina C (Figura 6), junto con una variedad de compuestos químicos, participan en la actividad antioxidante de la miel (Cauich *et al.*, 2015). El ácido ascórbico puede ser donante de electrones y podría determinar reacciones en cadena de radicales libres al convertirlos en productos más estables (Ávila *et al.*, 2018).

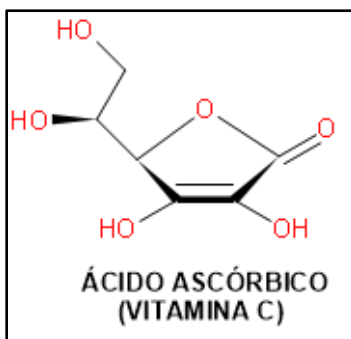


Figura 6. Estructura química de la vitamina C.

Para la determinación de vitamina C en la miel de *S. mexicana*, se lleva a cabo la técnica colorimétrica usando el reactivo de Folin (Jagota y Dani, 1982). El reactivo de Folin, el cual es un agente oxidante, expone un color azul en reacciones de reducción y se utiliza para la estimación de proteínas a un pH de 10, pero se ha observado que el ácido ascórbico interfiere con esta estimación. De acuerdo con lo anterior, Jagota y Dani 1982 desarrollan una nueva técnica donde en un rango de pH ácido, el ácido ascórbico puede estimarse mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu. El procedimiento que se debe seguir se encuentra descrito en el apéndice IV.

➤ **Fenoles y flavonoides**

Los tres grupos más importantes en los que se dividen los compuestos fenólicos son los ácidos fenólicos, flavonoides y polifenoles. El conocimiento del contenido de fenoles y flavonoides en mieles podría ser un indicador potencial de su capacidad biológica (Cauich *et al.*, 2015). Además, Abd *et al.* 2017 mencionan que estos componentes fitoquímicos contribuyen en los efectos antibacterianos y propiedades antiinflamatorias de la miel.

Los compuestos fenólicos están formados por un anillo aromático unido por lo menos a un grupo oxhidrilo (Figura 7). La estructura más sencilla es la del ácido benzoico, pero con otros sustituyentes en el anillo se forman distintos ácidos fenólicos. Dicha composición les proporciona propiedades bactericidas, fungicidas y antivirales (Bedascarrasbure *et al.*, 2004).

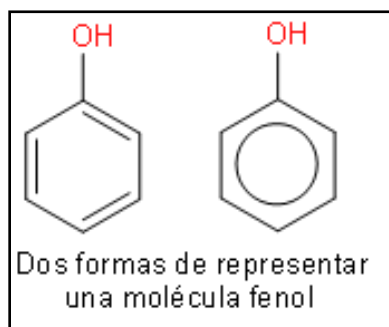


Figura 7. Estructura molecular general de un fenol

Mientras que los flavonoides están conformados por una estructura básica que consiste en 2 anillos bencénicos en los extremos de la molécula, unidos por un anillo de 3 átomos de carbono a la que se pueden adicionar grupos tales como oxhidrilos, metilos, azúcares, etc. (Figura 8). Estos compuestos tienen importantes propiedades antioxidantes ya que minimizan la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres (Bedascarrasbure *et al.*, 2004).

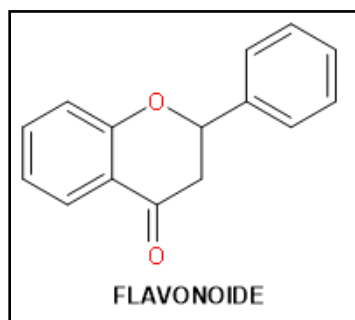


Figura 8. Estructura molecular general de un flavonoide

Para la determinación cuantitativa de contenido total de fenoles en la miel de *S. mexicana*, puede lograrse con base a la técnica de Singleton y colaboradores en 1999, utilizando un espectrofotómetro, el reactivo de Folin-Ciocalteu y como estándar, ácido gálico (Ciappini *et al.*, 2013) (Apéndice V).

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos (fosfomolibdicos-fosfotúngstico). La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos mencionados anteriormente en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional a este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Avella *et al.*, 2008).

Por otro lado, para la evaluación de los flavonoides, en primer lugar, se recomienda comprobar su presencia utilizando NaOH al 20%. Se llevará a cabo el siguiente procedimiento (DOF, 2017):

1. Pesar 200 miligramos de las muestras, añadir 1 ml de etanol al 70% y mezclar perfectamente.
2. Añadir una gota de NaOH al 20% y observar un cambio de coloración que va del amarillo a naranja de acuerdo con la cantidad de flavonoides presentes.
3. Un color amarillo intenso es característico de flavonoides, en cambio sí se presenta un color amarillo débil la prueba es considerada como negativa.

Una vez que se compruebe la presencia de flavonoides, estos compuestos se extraen por medio de una hidrólisis ácida disolviendo 3 mg de miel en 6 ml de HCl 2M, posteriormente se deja en un baño con agua hirviendo durante 1 hora. Cumplido este tiempo el extracto se neutraliza con NaOH 2M. Finalmente, se agrega diclorometano grado HPLC y se recuperan las 2 fases que correspondan a la fase de diclorometano. Por último, se obtiene el rendimiento una vez que el solvente se evapore, pesando la cantidad obtenida de la extracción. Todo lo anterior con el objetivo de ocupar este extracto para la cuantificación de flavonoides totales.

Entonces, con el extracto obtenido de flavonoides, se determina el contenido total de estos mediante su reacción con tricloruro de aluminio ($AlCl_3$) y quercetina como patrón (Ciappini

et al., 2013) (Apéndice VI). El principio básico de esta técnica es que el AlCl_3 forma complejos estables de ácidos con el grupo cetona C-4 o bien con el grupo hidroxilo C-3 o C-5 de las flavonas y los flavonoles. Además, también forma complejos lábiles ácidos con los grupos hidroxilo en el anillo A o B de los flavonoides (DOF, 2017).

6.4 Capacidad antioxidante

Los seres humanos necesitan oxígeno (O_2) para la producción de energía y realizar todas las actividades fisiológicas. Sin embargo, el exceso de este elemento en las células resulta nocivo debido a la formación de especies reactivas generadas durante el proceso de oxidación. En el organismo existe un equilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ERO) y los sistemas de defensa antioxidante (AOX). El efecto dañino de los radicales libres en los sistemas biológicos producen estrés oxidativo generado por la deficiencia de antioxidantes e incremento de las ERO (Cauich *et al.*, 2015).

Como se mencionó, los agentes antioxidantes son los encargados de evitar que las ERO causen efectos dañinos sobre las células. Ejemplos de ERO son el superóxido, peróxido y radicales hidroxilos. Estos se originan a partir de estresores endógenos, resultantes de los subproductos naturales del metabolismo celular, o de estresores exógenos como la luz UV, contaminantes, drogas, humo o radiación. Cabe mencionar que, estas moléculas reactivas provocan el deterioro de membranas, lípidos, aminoácidos y también del ADN (Abd *et al.*, 2017).

Los antioxidantes pueden ser categorizados en dos tipos principales: enzimáticos y no-enzimáticos. Los antioxidantes enzimáticos (p.ej.: catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, etc.) transforman un radical libre a una molécula estable que es menos dañina. Mientras que los antioxidantes no-enzimáticos (p.ej.: ácido ascórbico, carotenoides, compuestos fenólicos etc.) bloquean y cortan la cadena de reacción del daño causada por los ROS o inhiben la formación de radicales libres (Abd *et al.*, 2017).

Para evaluar la capacidad antioxidante de la miel de *S. mexicana*, se emplea el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, o mejor conocido como DPPH• (DOF, 2017). Este método consiste en la reducción del DPPH• que se monitorea por la disminución en la

absorbancia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH• absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante (Figura 9), esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición de DPPH• proporciona un índice para estimar la capacidad de las muestras de prueba para atrapar radicales libres (DOF, 2017).

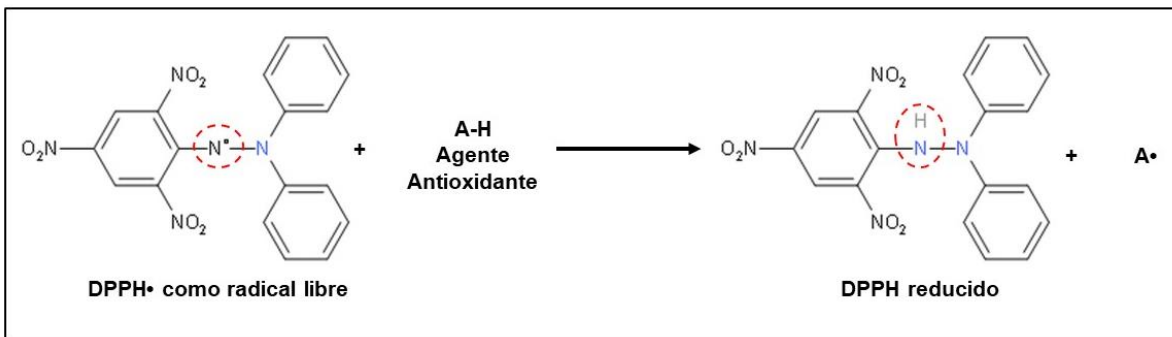


Figura 9. Reacción de reducción del radical DPPH• en presencia de algún antioxidante.

El procedimiento que se realiza para esta técnica se encuentra descrito en el apéndice VII.

6.5 Detección de esporas de hongos

La existencia de miel acuosa de abejas sin agujón se relaciona con la humedad de los ambientes tropicales, en los cuales es difícil extraer el néctar con bajo contenido de agua. Esta condición rica en agua permite la supervivencia y actividad de microorganismos que pueden fermentar la miel naturalmente cuando se almacena en las colmenas (Ávila *et al.*, 2018). Sin embargo, Abd *et al.* 2017 mencionan que la mayoría de los organismos que puedan desarrollarse en la miel son probióticos y trabajan junto con las abejas secretando enzimas benéficas para enriquecer y conservar la calidad de la miel.

Por lo tanto, la miel es un recurso fácil de conservar debido a sus características intrínsecas que inhiben el crecimiento microbiano (p.ej.: pH, acidez o viscosidad). Aun así, errores y problemas de manejo durante su producción pueden influir sobre su calidad microbiológica (Fernández y Gallez, 2008). Schencke *et al.* 2016 mencionan que es de importancia considerar que la miel podría causar intoxicaciones sistemáticas debido a la probable presencia de endosporas latentes.

Dada la controversia entre los investigadores de considerar a la miel como una sustancia confiable o no, lo que se pretende en este estudio es detectar la presencia de esporas de

hongos en la miel extraída de *S. mexicana* utilizando azul de algodón con el objetivo de teñirlas e identificarlas.

Por otro lado, existe un criterio de calidad de la miel que nos permite conocer si esta será afectada por la presencia de microorganismos que aceleren su proceso de fermentación, conocida como la actividad de agua (a_w). Esta puede obtenerse directamente por medio de un instrumento como Aqualab®. Se entiende como actividad de agua a la humedad en equilibrio de un producto, determinado por la presión parcial del vapor de agua en su superficie.

De acuerdo con Ávila *et al.* (2018), la actividad de agua necesaria para el desarrollo de microorganismos es inferior a 0.98 y depende del tipo de microorganismo (alrededor de 0.7 para los mohos; 0.8 para levaduras y 0.9 para bacterias). Dado a que las levaduras osmofílicas solo pueden crecer en niveles de actividad del agua por encima de 0.6, la miel de abeja sin aguijón que se produzca no se consideraría segura con respecto a la fermentación.

6.6 Bioensayos: actividad antimicrobiana

Los microorganismos existen dentro de todas las heridas, pero la mayoría no las perjudican. Lo anterior depende del equilibrio entre el sistema inmune del individuo y la biocarga (número de bacterias) que podría contaminar la herida. Muchas bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* y otras especies coliformes, tienden a perturbar el proceso de cicatrización (Abd *et al.*, 2017).

Por otro lado, como se mencionó con anterioridad, se ha reportado que, durante la construcción de las colmenas y la producción de miel, existen muchos microorganismos en el cerumen (mezcla de propóleo y cera para la edificación). Dado a lo anterior, hoy en día persiste un cierto dilema si la aplicación de miel en las heridas tendría un impacto negativo en el proceso de cicatrización. Sin embargo, se argumenta que los microorganismos identificados en la miel no son patógenos, los cuales pertenecen al género *Bacillus* y actinomicetos *Streptomyces* (Abd *et al.*, 2017).

La actividad antimicrobiana de miel de abejas sin aguijón se ha validado ampliamente por medio de la prueba antibiótica de Kirby-Baüer, la prueba de dilución en agar, microdilución en caldo y la evaluación de viabilidad de tiempo de muerte, donde se ha observado que la miel tiene la gran habilidad de inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y algunos hongos. En conclusión, la miel de abejas sin aguijón puede ser usada como un ingrediente antimicrobiano en formulaciones farmacéuticas (Abd *et al.*, 2017).

En esta investigación para corroborar la actividad antibacteriana de la miel de *S. mexicana*, se propone el uso del método de difusión en agar de Kirby-Bauer utilizando como medio de cultivo caldo y agar Müeller-Hinton (Rodríguez *et al.*, 2005). Además, se deben utilizar bacterias Gram-positivas y Gram-negativas de interés clínico (Cuadro 3) y como control positivo cloranfenicol (25 µg por disco). Por último, se deben realizar pozos en el agar para colocar la miel directamente, por triplicado.

Cuadro 3. Bacterias que se utilizan en los bioensayos

Bacterias Gram-positivas	Bacterias Gram-negativas
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	

En cuanto a la actividad antifúngica, se propone el uso de cepas de levaduras y hongos filamentosos (Cuadro 4) usando el método de difusión de agar (CLSI, 2012) y el método de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002). Para el control positivo se emplean sensidiscos con nistatina (25 µg por sensidisco). Finalmente, se coloca directamente la miel dentro de pozos realizados en el agar, esto por triplicado.

Cuadro 4. Hongos y levaduras que se utilizaran en los bioensayos

Cepas de levaduras	Hongos filamentosos
<i>Candida albicans</i>	<i>Fusarium sporotrichioides</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>

6.7 Actividad cicatrizante

La cicatrización es un proceso biológico extraordinario que restaura la integridad de la piel después de una lesión, la cual se define como el reemplazo de células y tejidos mediante regeneración, donde las células pueden ser similares o diferentes a las perdidas (Salas *et al.*, 1994). A la miel se le atribuye diferentes propiedades cicatrizantes que la hacen un elemento ideal para el tratamiento de heridas. Las principales propiedades de la miel que están involucrados en la cicatrización son las antioxidantes, antibacterianas y antiinflamatorias. Además, la miel es capaz de mantener una herida en condiciones sanitarias, promueve la actividad angiogénica, también induce la formación de tejido granular y de reepitelización (Abd *et al.*, 2017).

Para la evaluación de la actividad cicatrizante de miel de *S. mexicana* se pueden llevar a cabo las técnicas de fuerza y velocidad de cierre de la herida, además del análisis histológico aplicando las tinciones hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson. Se recomienda utilizar 36 ejemplares machos de *Mus musculus* cepa CD1, los cuales deben de ser proporcionados por el Bioterio de la FESI con las siguientes características: ratones jóvenes (8 semanas), cuyo peso aproximado sea de 22.0–23.0 g (Haryanto *et al.*, 2012).

➤ Fuerza y velocidad de cierre de la herida

Salas *et al.* 1994 argumentan que la reparación del tejido conectivo durante el proceso de cicatrización es el de mayor importancia. Lo anterior es posible evaluarlo a través de un modelo experimental de cicatrización *in vivo*, provocando heridas en la epidermis y aplicando tópicamente la sustancia en estudio. Para evaluar la recuperación del tejido perdido, se ejerce tensión sobre la herida hasta abrirla de nuevo, obteniendo así un porcentaje de fuerza, donde el producto en evaluación se considera cicatrizante cuando el porcentaje es mayor del 25%.

En cuanto a la velocidad, nos muestra el avance de curación de la herida, midiendo la misma con un vernier, evaluando así la contracción de la herida a través del tiempo. El procedimiento llevar a cabo estas técnicas se encuentra descrito en el apéndice VIII.

➤ **Histología**

La histología es definida como la ciencia de los tejidos orgánicos y es comúnmente considerada una rama de la biología que estudia la estructura de los tejidos que constituyen las plantas y los animales (Salazar y Moreno, 2016).

En este estudio, se procesarán los tejidos obtenidos de la piel lesionada, posteriormente se llevan a cabo las tinciones correspondientes. Por ende, se extraerá la piel y se montará en cassetes sumergidos en formol al 10% amortiguado con sales de fosfato con un pH de 7, las muestras se dejan en esta solución durante 24 horas, posteriormente los tejidos son sometidos a un tren de alcoholes de diferentes concentraciones (70, 80, 90 y 100%) para su deshidratación. Una vez terminado este proceso se dejan en butanol durante 2 horas (aclaramiento). Los tejidos aclarados se depositan en parafina durante 48 horas para concluir con la inclusión del tejido el cual se deberá dejar durante 24 horas en el congelador antes de llevarlo al micrótopo.

Tinción hematoxilina-eosina (H-E)

La tinción H-E es el método de tinción más popular utilizado en investigación y medicina diagnóstica. La hematoxilina es una sustancia capaz de colorear los componentes de los tejidos y las células (p.ej.: núcleos celulares), al ser un colorante básico, tiñe las estructuras ácidas en azul y púrpura. Mientras que la eosina es un colorante acidófilo que le permite enlazarse con constituyentes celulares de carga positiva, por lo que tiñe de color rosa organelos citoplasmáticos, fibras elásticas, colágeno y fibras musculares (Salazar y Moreno, 2016). Esta tinción se lleva a cabo con el fin de observar la recuperación del tejido lesionado y la histología general de la epidermis.

Tinción tricrómica de Masson (TM)

La tinción TM es una técnica que está indicada para la tinción de tejido conjuntivo. Los elementos más frecuentes hallados en este tejido son las fibras de colágeno. Por lo tanto, esta técnica permite visualizar claramente las fibras de colágeno tipo I que forman fibras gruesas o haces, diseñados para dar resistencia, también evidencian, aunque en menor intensidad, las fibras reticulares. Se emplean tres colorantes para diferenciar el núcleo celular (hematoxilina férrica), el citoplasma (fucsina) y las fibras de colágeno (azul de

anilina) (Salazar y Moreno, 2016). Esta tinción se lleva a cabo con el fin de diferenciar los componentes que conforman la cicatriz en la epidermis y la identificación de fibras a través del microscopio óptico.

El procedimiento para realizar ambas tinciones se encuentra en el apéndice IX.

7. Resultados

7.1 Uso de la miel de abejas Meliponini en la medicina tradicional

En Mesoamérica las abejas sin aguijón han representado un importante patrimonio biocultural, pues desde la época prehispánica numerosos grupos las han manejado, aprovechando sus productos con fines rituales, comestibles y terapéuticos (Cano-Contreras *et al.*, 2013). En el caso de México, los meliponinos endémicos jugaron un papel significativo para los Mayas, una de las civilizaciones antiguas más importantes en el mundo, donde estas abejas y sus productos eran utilizados ampliamente para diferentes propósitos, como el arte, manejo de la polinización en cultivos, extracción de miel, de cerumen, de polen y especialmente su uso en la medicina tradicional (Ayala *et al.*, 2012).

Asimismo, diversos autores se han dedicado a la tarea de publicar escritos reportando el uso cotidiano o económico, creencias, nombres locales y formas tradicionales de manejo de abejas sin aguijón en el país.

Canul-Heredia *et al.* 2017 mencionan algunos usos generales de la miel de especies nativas pertenecientes al territorio mexicano:

- Tratamiento de afecciones como úlceras en la boca, erupciones en la piel y problemas urinarios.
- Restablecimiento de las mujeres que acaban de dar a luz o curación del sudor de noche.
- Tratamiento de la catarata en los ojos y para aliviar golpes en los ojos de los animales.

Scaptotrigona mexicana es comúnmente conocida como “negrita” (Vit *et al.*, 2004). Reyes *et al.* 2014 mencionan que los pueblos Náhuatl y Totonaca de la Sierra Norte manejan

principalmente *S. mexicana* (“*pisil-nekmej*”), dada a su alta demanda y comercialización regional por su miel medicinal. Del mismo modo, Salazar-Vargas *et al.* (2017) argumentan que esta especie ha mostrado un gran potencial comercial, además la miel, polen, propóleo y cerumen poseen un alto valor cultural, nutricional y medicinal. De acuerdo con Vit *et al.* 2004, la miel de *S. mexicana* es principalmente empleada para aliviar infecciones respiratorias. Jiménez *et al.* (2016) reportan las características de la miel que la hacen potencialmente medicinal gracias a sus propiedades antibacterianas y antioxidantes.

7.2 Pruebas fisicoquímicas en la miel de *S. mexicana*

Cuando obtenemos resultados a partir de los análisis de las propiedades físicas y químicas de la miel de abejas, no debemos olvidar la consideración de algunos aspectos, como la especie en estudio, la zona geográfica, las condiciones ambientales, el recurso floral visitado, la forma de extracción y almacenamiento de las muestras de miel. La finalidad de este apartado radica en la búsqueda de información bibliográfica que posiblemente respalden los resultados que podrían esperarse de la presente investigación de la miel de *S. mexicana*.

La calidad de la miel es principalmente determinada por sus características sensoriales, químicas, físicas y microbiológicas. No obstante, los criterios fisicoquímicos de calidad de la miel son muy específicos para la abeja europea *A. mellifera* solamente (Jiménez *et al.*, 2016). Además, aunque muchas especies de *Apis* y de abejas sin aguijón son aprovechadas por los humanos como recursos alimenticios, la definición oficial de miel está limitada a la producida por *A. mellifera* (Vit *et al.*, 2004). Cabe mencionar que muchos de los criterios de calidad revelan el uso potencial de la miel como medicina alternativa (Jiménez *et al.*, 2016).

➤ Propiedades organolépticas

El origen botánico de la miel determina diversas características, pero en cuanto a las propiedades organolépticas, el color se relaciona con los contenidos de minerales, polen y compuestos fenólicos, mientras que el aroma depende de los ácidos y aminoácidos que contenga la miel (PROFECO, 2015). El sabor se relaciona por la cantidad elevada de

azúcares presentes en la miel (80% del peso seco) o la acidez, mientras que la viscosidad depende de su composición química, contenido de agua y temperatura (Suescún y Vit, 2008).

- a) **Color:** el color es una propiedad física que es inmediatamente percibida por el consumidor, la cual puede influir en la aceptación o rechazo del producto. La miel de abejas sin aguijón presenta colores que pueden ser claros, ámbar o marrones, pero en cuanto a la miel de *S. mexicana*, es considerada como una miel oscura (Reyes *et al.*, 2016; Espinoza-Toledo *et al.*, 2018).
- b) **Sabor y olor:** como se mencionó con anterioridad, el sabor puede relacionarse con la cantidad de azúcares en la miel. Sin embargo, todas las mieles presentan reacción ácida, característica que tiene un marcado efecto en su sabor (Díaz y Fernández, 1998). La miel presenta valores de pH bajos, que pueden ir desde 3.0 - 4.9 (Lullah-Deh *et al.*, 2018). Reyes *et al.* (2016) mencionan que la miel de *S. mexicana* se distingue por su fuerte sabor ácido.
- c) **Viscosidad:** Suescún y Vit (2008) mencionan que se debe considerar que la miel en estado líquido suele ser muy viscosa, ya que esta propiedad depende de su composición química, contenido de agua y temperatura. Reyes *et al.* (2016) argumentan que los tipos y concentración de azúcares presentes en la miel de *S. mexicana* influye en su viscosidad, donde presenta una baja fluidez, pero alto contenido de agua.

➤ **Caracterización química de la miel**

Vit *et al.* (2004) proponen estándares de calidad para distintos géneros de abejas sin aguijón comparándolos con los establecidos internacionalmente para *A. mellifera*. Algunos de estos están representados en el cuadro 5 con respecto al género *Scaptotrigona*. La anterior tabla nos permitiría conocer si la miel en estudio podría estar dentro de los parámetros que la consideren de buena calidad.

Cuadro 5. Estándares de calidad para las mieles de *Scaptotrigona* (Vit *et al.*, 2004)

Composición de la miel	Estándares	
	<i>A. mellifera</i>	<i>Scaptotrigona</i>
Contenido de agua (g/100g)	Máx. 20.0	Máx. 30
Azúcares reductores (g/100g)	Min. 65.0	Min. 50.0
Sacarosa (g/100g)	Máx. 5.0	Máx. 2.0
Acidez (meq/100g)	Máx. 40.0	Máx. 85.0

- a) pH:** la miel de *S. mexicana* se distingue por su sabor ácido (Reyes *et al.*, 2016), dado a que esta presenta valores de pH bajos, que pueden ir desde 3.0 - 4.9 (Lullah-Deh *et al.*, 2018). Además, este valor puede reflejar los componentes presentes en la miel (Reyes *et al.*, 2016).
- b) Densidad:** como se menciona con anterioridad, la densidad de la miel puede ser baja o alta. De acuerdo con Lullah-Deh *et al.* (2018) si la miel presenta un valor de alta densidad, la miel es considerada de buena calidad. Suescún y Vit (2008) argumentan que la densidad de la miel debe de estar comprendida entre los 1.39 y 1.44 kg/L.
- c) Humedad:** conocer la humedad o contenido de agua de las mieles es importante porque determina su grado de conservación, dado a que es un factor que influye directamente en la fermentación de la miel durante su almacenamiento (Suescún y Vit, 2008). Vit *et al.* (2004) establecen que la miel de *Scaptotrigona* es aceptable cuando se obtiene como máximo 30 g/100g de muestra.
- d) Ácidos orgánicos:** la acidez nos habla acerca de la resistencia de deterioro del producto a causa de la fermentación. La acidez de la miel de abejas sin aguijón es muy alta compara con la de *A. mellifera*. Además, la fermentación es inaceptable en la miel de *Apis*, sin embargo, se cree que la miel fermentada de abejas sin aguijón es más eficaz en el tratamiento de distintas enfermedades. Por lo tanto, es indispensable mostrar sus propiedades medicinales y proporcionar información para que la aceptación del consumo de la miel de Meliponini sea con base en sus propiedades medicinales (Vit *et al.*, 2004).

Como se refleja en el cuadro 5, Vit *et al.* 2004 establecen que la miel de *Scaptotrigona* es aceptable cuando se obtiene como máximo 85 meq/100g de acidez.

- e) **Carbohidratos:** la cantidad de azúcares como la glucosa y fructosa en la miel de *S. mexicana* influyen en su viscosidad. Además, esta concentración de azúcares reductores se ve afectado por el contenido agua en las muestras. Se ha reportado el porcentaje de azúcares reductores de *S. mexicana*, el cual fue cerca de un 52.57-59.16 % (Jiménez *et al.*, 2016). Cabe mencionar que Vit *et al.* 2004 (Cuadro 5) establecen para esta miel como mínimo 50.0 g/100g de azúcares reductores presentes.
- f) **Proteínas:** en comparación de la cantidad de azúcares que contiene la miel, las proteínas sólo conforman aproximadamente el 0.5% (Cauich *et al.*, 2015). Contreras-Oliva *et al.* (2018) caracterizan el polen de las colmenas de *S. mexicana* localizadas en algunos municipios de Veracruz. Mencionan que el polen es la principal fuente de alimento de las larvas, el cual contiene entre el 10-40% de proteínas, dependiendo de los factores biológicos. Determinan la cantidad de proteína por medio del método de Kjeldahl, donde obtuvieron de un 20 – 22 g/100 g a partir del polen.
- g) **Ácido ascórbico:** Jiménez *et al.* (2016) reportan el contenido de vitamina C en la miel de *S. mexicana* que obtuvieron, el cual fue de 280 ± 30 mg/kg. Mencionan que esta miel contiene más ácido ascórbico que lo reportado en otras mieles, lo cual podría explicar su sabor ácido.
- h) **Fenoles y flavonoides:** Jiménez *et al.* 2016 reportan que la evaluación del contenido de fenoles totales en miel de *S. mexicana* vario de 25.85 a 40.1 mg AG/100 g. En el caso del contenido de flavonoides totales, Jiménez-Díaz (2019) obtuvo de las muestras de miel de *S. mexicana* extraídas de alguna región en Puebla, de 2.82 a 10.95 µg QE/g.

7.3 Capacidad antioxidante

La miel se constituye de diferentes compuestos como los carotenoides, vitamina C, fenoles y flavonoides que influyen en su actividad antioxidante. Para determinar si existe una relación entre la capacidad antioxidante entre el contenido de fenoles y flavonoides o el

contenido de ácido ascórbico, estos podrían correlacionarse entre sí. Sin embargo, la capacidad antioxidante mediante la oxidación del radical DPPH• reportada para la miel de la especie en estudio es de 17.07 ± 4.30 % (Jiménez *et al.*, 2016).

7.4 Presencia de esporas de hongos

Con el fin de detectar errores durante el manejo o extracción de la miel de *S. mexicana* que podrían provocar intoxicaciones sistemáticas debido a la presencia de patógenos, una gota de miel será teñida con azul de algodón para identificar esporas. Sin embargo, se espera que no exista presencia de éstas. Por otro lado, se propone el uso de evaluar la actividad del agua que nos indicaría si la miel será o es afectada por la presencia de microorganismos que la deterioren. Jiménez *et al.* (2016) reporta la actividad del agua para *S. mexicana*, la cual presentó un valor de 0.715 a 25° C.

7.5 Actividad antimicrobiana

Diversos estudios realizados sobre la miel de *S. mexicana* afirman su actividad antibacteriana en contra de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas de importancia médica (Dardón y Enriquez, 2008; Kimoto-Nira y Amano, 2008; Jiménez *et al.* 2016; Grajales-Conesa *et al.*, 2018). Además, se afirma la inhibición de ciertos hongos o levaduras (Dardón y Enriquez, 2008). En cambio, se reporta que en algunas concentraciones de esta miel no muestran inhibición en contra de algunos hongos o levaduras dada a su alta resistencia (Jiménez *et al.* 2016).

7.6 Actividad cicatrizante

La miel de abejas sin aguijón no es solamente consumida directamente, también es utilizada en la medicina tradicional ya sea sola o mezclada con plantas medicinales. Es usada en el tratamiento de tumores, conjuntivitis, cataratas oculares, inflamaciones, dolor, infecciones de garganta, hematomas, limpieza de sangre después del parto, enfermedades renales y cicatrización de heridas (Ávila *et al.*, 2018).

Alves *et al.* 2008 evalúan la aplicación tópica de miel de una especie perteneciente al género *Melipona* en heridas infectadas de ratas. Concluyen que la aplicación de esta miel sobre heridas infectadas reduce la infección y el tiempo de curación.

Medeiros *et al.* 2016 evalúan las propiedades y efectos curativos de la miel de una especie perteneciente al género *Melipona* en heridas infectadas de ratas. Concluyen que esta miel fue eficaz para el tratamiento de las heridas infectadas inhibiendo el importante crecimiento bacteriano, además mejoró la expresión de citocinas e influyó positivamente en la reparación de las heridas.

Nufio-Oliva 2018 compara el efecto cicatrizante de miel de *A. mellifera* y *M. beecheii* después de realizar orquiectomías en conejos macho. Propone el uso potencial de estas sustancias como alternativas naturales que mostraron mejor actividad ante sustancias comerciales.

Nordin *et al.* 2018 utilizan la miel de dos especies de abejas sin aguijón pertenecientes al género *Trigona*, de la cual evalúan su potencial cicatrizante por medio de la viabilidad de fibroblastos dermales humanos. Concluyen que al observar el efecto positivo que tiene la miel sobre la viabilidad celular y la proliferación de fibroblastos sugirió la potencial capacidad de la miel de meliponinos para mejorar la cicatrización de heridas.

De acuerdo con lo anterior, se esperaría que la miel de *S. mexicana* demuestre gran efectividad durante la cicatrización de heridas.

8. Conclusión

Las principales propiedades de la miel que están involucrados en la cicatrización son las antioxidantes, antibacterianas y antiinflamatorias, lo anterior gracias a todos los compuestos químicos que la componen (Figura 10). Sin embargo, a pesar de que algunas características de la miel de *S. mexicana* serían inaceptables para la comercialización de su miel, estas deben de ser tomadas en cuenta para su uso principal en la medicina tradicional.

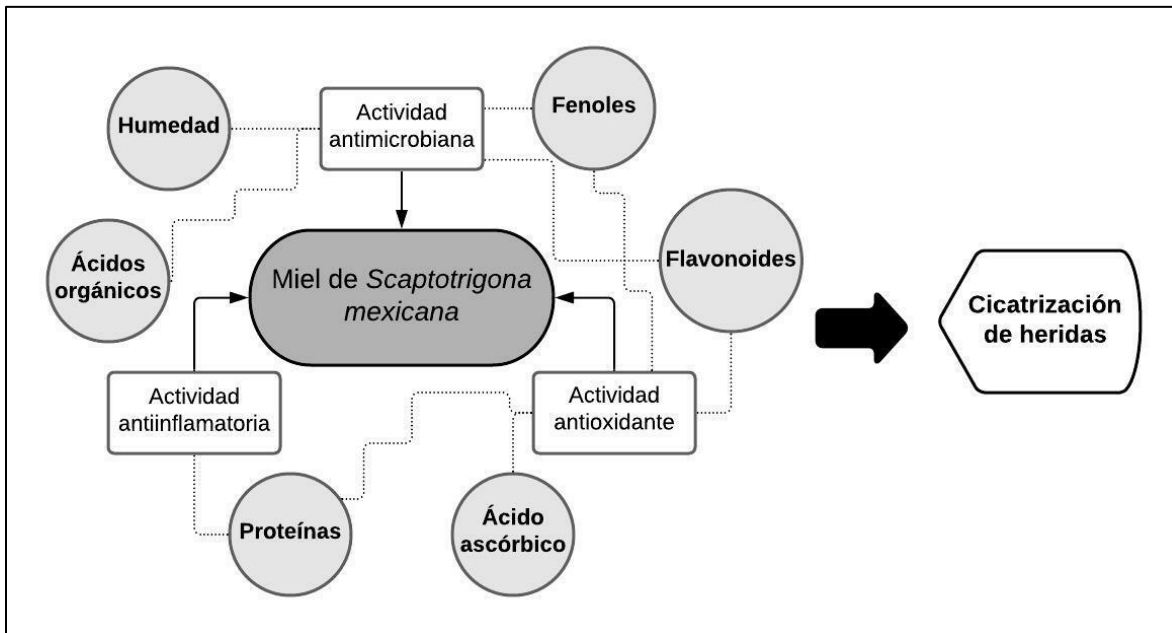


Figura 10. Propiedades principales de la miel que están involucradas en la cicatrización eficaz de heridas

9. Aportaciones y trascendencia

- Esta investigación aporta una síntesis de las técnicas que pueden llevarse a cabo para el estudio organoléptico y fisicoquímico de la miel de *S. mexicana*.
- Se propone como principal objetivo la evaluación de la actividad cicatrizante de la miel de *S. mexicana*.
- Se propone la identificación de esporas latentes de hongos patógenas en las muestras de miel de *S. mexicana*, también la evaluación de la actividad de agua.
- Se espera que este estudio apoye a la idea de que la miel de meliponinos en general debe de ser evaluada con fines medicinales, más que nutricionales.
- El uso de la miel de *S. mexicana* como suplemento medicinal es sustentado con información científica que permite su fiabilidad.

Apéndice I

Ácidos orgánicos

Procedimiento para llevar a cabo el método de volumetría para la determinación de ácidos orgánicos utilizando fenolftaleína como indicador (DOF, 2020):

1. Pesar 10 g de muestra de miel y disolver en 75 ml de agua destilada libre de CO₂.
2. Agregar 0.3 ml de fenolftaleína.
3. Titular con NaOH 0.1N. La titulación concluye cuando se obtiene un vire levemente rosáceo del indicador en la muestra de miel, ya que el cambio es equivalente a la cantidad del titulante utilizado con la concentración de la sustancia desconocida (miel), es decir, el punto estequiométrico de la reacción.

Los datos son expresados en miliequivalente de ácido por kilogramo de miel (meq/kg) y se empleara la siguiente fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Entonces: $C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2}$

Donde: C₁= concentración del titulante NaOH (0.1 N); V₁= volumen de NaOH gastado; C₂= concentración de ácidos orgánicos de la muestra (problema); V₂= volumen de la muestra problema.

Apéndice II

Carbohidratos

Procedimiento para la cuantificación de carbohidratos empleando el método de Nelson-Somogyi (Sadasivam y Manickam, 1996):

1. Pesar 100 mg de miel y agregar 2 ml de etanol al 80%.
2. Enfriar en un baño de hielo durante 15 minutos para precipitar proteínas.
3. Centrifugar a 10000 rpm durante 15 minutos, decantar el sobrenadante y evaporar en vacío a sequedad.
4. Agregar a la muestra 5 ml de agua destilada.
5. Preparar tubos para la curva patrón de acuerdo con el cuadro 6. Preparar el patrón de glucosa (200 µg/ml) disolviendo 1 mg de glucosa en 5 ml de agua destilada.

Cuadro 6. Curva patrón para la cuantificación de carbohidratos

	Tubos					
	1	2	3	4	5	6
Patrón de glucosa (ml)	-	0.25	0.50	0.75	1.0	-
Agua destilada (ml)	1.0	0.70	0.50	0.25	-	-
Problema (ml)	-	-	-	-	-	1.0
Reactivo de cobre (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

6. Tapar los tubos con papel aluminio y colocarlos en baño con agua durante 20 minutos. Enfriar con agua corriente.
7. Agregar a cada tubo 1 ml del reactivo arsenomolibdato.
8. Agregar a cada tubo 7.5 ml de agua destilada.
9. Mezclar por inversión y leer en el espectrofotómetro a 540 nm utilizando el tubo 1 como blanco.
10. Construir curva patrón e interpolar la absorbancia de los tubos problema.

Preparación del reactivo de Cobre: mezclar 400 ml de agua destilada más 40 g de carbonato de sodio anhidro y disolver. Agregar 7.5 g de ácido tartárico y disolver otra vez.

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.

Preparación del 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% (Na_2HAsO_3). Mezclar bien e incubar a 37 °C durante 24 a 48 horas. Envasar en frasco ámbar.

Apéndice III

Proteínas

Se evaluarán las proteínas empleando el método de Bradford y se llevará a cabo de la siguiente manera:

1. Pesar 50 mg de miel y homogeneizar en 2 ml de una mezcla de metanol-cloroformo-agua (12:5:3), centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos, con el fin de extraer las proteínas de la muestra.
2. Recuperar el sobrenadante y preparar los tubos para la curva patrón de proteínas utilizando albúmina bovina sérica (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) como patrón (Cuadro 7).
3. Las reacciones se harán en una placa ELISA y se leerán a 595 nm.

Cuadro 7. Curva patrón para la cuantificación de proteínas

	Tubos						
	1	2	3	4	5	6	7
Albúmina (μg)	10	8	6	4	2	1	-
Patrón de albúmina (μl)	100	80	60	40	20	10	-
Problema (μl)	-	-	-	-	-	-	10
Reactivo de Bradford (μl)	40	40	40	40	40	40	40

Preparación del reactivo de Bradford: pesar 100 mg de azul de Coomassie y disolver en 50 ml de etanol al 96% de ácido fosfórico al 85% y aforar a 1 litro con agua destilada, filtrar y almacenar en frasco ámbar, madurar durante 12 h.

Apéndice IV

Ácido ascórbico

Se seguirá el siguiente procedimiento empleando el reactivo Folin-Ciocalteu (Jagota y Dani, 1982):

1. Mezclar 900 μl de ácido tricloroacético al 10% a 100 mg de miel y colocarlo en un baño de hielo durante 5 minutos. Después centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos y recuperar sobrenadante.
2. Preparación del problema: utilizar alícuotas de 500 μl de sobrenadante, diluir estas en 4.3 ml de agua destilada en conjunto de 0.2 ml del reactivo Folin-Ciocalteu, agitar vigorosamente hasta homogeneizar.
3. Preparar la curva patrón (Cuadro 8) con un stock de ácido ascórbico, disolviendo 5 mg de ácido ascórbico en 5 ml de agua.
4. Leer a 760 nm y realizar las interpolaciones correspondientes.

Cuadro 8. Curva patrón del ácido ascórbico

Tubo	Ac. Ascórbico μg	Vol. Stock $\mu\text{L/ml}$	Reactivo Folin(2N)ml	Agua destilada ml	Problema μL
0	-	-	0.2	4.8	-
1	5	25/0.025	0.2	4.775	-
2	10	50/0.05	0.2	4.75	-
3	15	75/0.075	0.2	4.725	-
4	20	100/0.1	0.2	4.7	-
5	25	125/0.125	0.2	4.675	-
6	30	150/0.150	0.2	4.65	-
7	35	175/0.175	0.2	4.625	-
8	40	200/0.2	0.2	4.6	-
9	45	225/0.225	0.2	4.575	-
10	50	250/0.25	0.2	4.55	-
11	60	300/0.3	0.2	4.5	-

12	70	350/0.35	0.2	4.45	-
13	80	400/0.4	0.2	4.4	-
14	90	450/0.45	0.2	4.35	-
15	100	500/0.5	0.2	4.3	-
Problema	-	-	0.2	4.3	500

Apéndice V

Determinación cuantitativa de contenido total de fenoles

El procedimiento será descrito de acuerdo con lo elaborado por Ciappini *et al.* 2013:

1. Pesar 4 ± 0.01 g de miel y llevar a 25 ml con agua. Tomar 1 ml de esta solución y adicionar 10 ml de agua destilada y 1 ml de solución de Folin-Ciocalteu, agitar suavemente y dejar reposar durante dos minutos.
2. Agregar 2 ml de solución de Na_2CO_3 al 10% y aforar a 25 ml con agua destilada. Dejar reposar 2 horas a temperatura ambiente.
3. Leer absorbancia de la solución a 725 nm. Expresar los resultados como equivalentes de ácido gálico en 100 g de miel, de acuerdo con la curva de calibración obtenida con el estándar.

Apéndice VI

Determinación cuantitativa de contenido total de flavonoides

Ciappini *et al.* (2013) determinan el contenido de flavonoides espectrofotométricamente mediante la reacción de estos con tricloruro de aluminio (AlCl_3), basándose en la investigación realizada por Woisky y Salatino en 1998. A continuación, se enlistará el procedimiento:

1. Preparación de la muestra: disolver muestras en etanol al 70% y preparar una solución estándar de concentración de 0.2 mg/ml. Tomar una alícuota de 250 μl y agregar 750 μl de agua destilada para obtener una concentración de 0.05 mg/ml.

2. Preparación de la curva de calibración: a partir de la solución estándar de quercetina de 1 mg/ml, tomar alícuotas correspondientes para obtener concentraciones seriadas de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 µg/ml.
3. Preparación del blanco: tomar 1 ml de la solución de la muestra y agregar 1 ml de metanol.
4. Adicionar a cada tubo 1ml de solución de AlCl₃, esperar 10 minutos y determinar absorbancia a 425 nm.
5. Leer absorbancia a 425 nm. Expresar los resultados en mg de equivalentes de quercetina (QE)/100 g de miel, de acuerdo con lo obtenido en la curva de calibración.

Apéndice VII

Método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•)

Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos y plantas medicinales, pero aquella que ha recibido una gran preferencia entre los investigadores es la técnica que utiliza el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH• (Guija-Poma *et al.*, 2015).

Para llevar a cabo esta técnica, enseguida se enlistará su procedimiento (DOF, 2017):

Preparación de reactivos

1. Solución estándar de quercetina (1 mg/ml): pesar 10 mg de quercetina y aforar a 10 ml con metanol grado reactivo. Conservar protegido de la luz y en refrigeración.
2. Solución DPPH• (100 µM): pesar 2 mg, disolver y aforar a 50 ml con metanol grado reactivo. Conservar protegido a la luz y en refrigeración.

Preparación de la muestra:

1. Pesar 10 mg de la muestra y disolver en metanol grado reactivo, aforar a 10 ml.
2. Preparar concentraciones y evaluar en un rango de 1, 3, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 y 250 µg/ml.
3. Al tener las concentraciones anteriores listas colocar en tubos de ensaye 250 µl de la muestra y 750 µl de la solución DPPH•.

4. Proteger de la luz y dejar reposar durante 30 minutos.
5. Determinar la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro de absorción UV-VIS.
6. Como control negativo se utiliza metanol y como control positivo quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema.
7. Los resultados se reportan obteniendo el porcentaje de reducción y se calcula con la siguiente formula:

$$\% \text{ de reducción} = (Abs \text{ del DPPH} \bullet) - [Abs \text{ de la mezcla (DPPH} \bullet + \text{ compuesto problema)}] * 100$$

Apéndice VIII

Evaluación de la fuerza y velocidad de cierre de una herida (Salas *et al.*, 1994)

1. Fuerza

Serán depilados 18 organismos 24 horas antes del inicio del tratamiento para evitar que la piel de estos se irrite. Serán anestesiados por inhalación de isoflurano (Hawk *et al.*, 1999), posteriormente se llevarán a cabo procedimientos asépticos y antisépticos en la piel depilada y se procederá a realizar una incisión de 1 cm en la parte dorsal. Los grupos se clasificarán de la siguiente manera:

1. Tratamiento de heridas sin uso de alternativas curativas Grupo control (GC) (n=6)
2. Tratamiento de heridas con Recoverón NC® / Grupo control positivo (GT) (n=6)
3. Tratamiento de heridas con miel de *S. mexicana* (GM)(n=6)

El tratamiento de todos los grupos de aplicará cada 12 horas, durante 15 días. Después de este tiempo, los ratones serán sacrificados usando una cámara de CO₂. Inmediatamente después del sacrificio, se elegirán al azar 3 ratones por tratamiento para medir la resistencia de la herida a la tensión según el método tensiométrico modificado por Salas *et al.* (1994). El porcentaje de eficacia de curación de heridas se calculará como:

$$\% \text{ eficacia de cicatrización} = \frac{GC}{GS} \times 100$$

Donde: GC= gramos en que abre la piel cicatrizada; GS= gramos para abrir la piel sana.

De los 3 ratones restantes se extraerá la piel del dorso donde se infringió la herida, se fijará en formol al 10% y será procesada para el análisis histológico.

2. Velocidad

Serán depilados los 18 organismos restantes 24 horas antes del inicio del tratamiento para evitar que la piel de estos se irrite. Serán anestesiados por inhalación de isoflurano (Hawk *et al.*, 1999), posteriormente las heridas serán generadas usando un bisturí cilíndrico para biopsias de 5 mm (Haryanto *et al.*, 2012), procurando que la profundidad no rebase la hipodermis. Los tratamientos y grupos experimentales serán los mismos que en la evaluación de la fuerza de cierre. Cada 2 días se medirá el diámetro de la herida con un calibrador vernier digital, y se calculará la contracción de la herida usando la siguiente ecuación:

$$\frac{(\text{Diámetro del día } x) (100)}{\text{Diámetro del día } 0}$$

Donde: Día x= diámetro de la herida al día posterior específico; Dia 0= diámetro de la herida en el día cero.

En donde se graficarán los tratamientos contra el % de velocidad de cierre.

Al día 15 del tratamiento, los ratones serán sacrificados en cámara de CO₂, posteriormente se extraerá la piel del dorso donde se infringió la herida, estas se fijarán en formol al 10% y serán procesadas para el análisis histológico.

Apéndice IX

Tinción hematoxilina-eosina (H-E) y tricrómica de Masson (MT)

Se realizarán cortes histológicos de 3 o 5 µm con un microtomo, se estirarán las muestras con alcohol para posteriormente pegar el tejido al portaobjetos en el baño de flotación. Las laminillas se dejarán secar y se removerá la parafina excedente en un horno de calor seco a 56°C durante 24 horas, si aún queda parafina después de las 24 horas se le agregará Xilol. Una vez realizados los métodos anteriores se deberán rehidratar los tejidos con soluciones decrecientes de etanol (100, 90, 80 y 70%).

➤ **Tinción H-E**

En cuanto a la tinción hematoxilina-eosina (Santos-Vidal, 2017), enseguida se enlistará el proceso de los tejidos a teñir:

1. Desparafinar las muestras.
2. Xilol I – 5 minutos
3. Xilol II – 10 minutos
4. Alcohol 100% - 10 lavados
5. Alcohol 90% - 10 lavados
6. Alcohol 80% - 10 lavados
7. Alcohol 70% - 10 lavados
8. Agua corriente – 10 lavados
9. Hematoxilina - 1 minuto.
10. Agua corriente – 1 lavado
11. Alcohol ácido – 1 lavado
12. Agua corriente – 10 lavados
13. Carbonato de litio – Hasta que vire
14. Agua corriente – 1 lavado
15. Alcohol 100% - 10 lavados
16. Eosina – 7 minutos
17. Alcohol 70% - 10 lavados
18. Alcohol 80% - 10 lavados
19. Alcohol 80% - 10 lavados
20. Alcohol 90% - 10 lavados
21. Alcohol 100% - 10 lavados
22. Xilol I – 10 lavados
23. Xilol II – Hasta que se monte
24. Montar

➤ **Tinción MT**

En cuanto a la tinción tricrómica de Masson, enseguida se enlistará el proceso de los tejidos a teñir (Cáceres *et al.*, 2017):

1. Desparafinar e hidratar en agua destilada las muestras
2. Formaldehído - fijar
3. Solución de Bouin - 1 hora a 56-60 °C
4. Enfriar
5. Agua corriente – lavar hasta desaparecer el color amarillo
6. Hematoxilina férrica– 10 minutos
7. Agua corriente – 1 lavado, 10 minutos
8. Agua destilada – 1 lavado
9. Escarlata fucsina ácida – 2 o 5 minutos
10. Agua destilada – 1 lavado
11. Ácido fosfomolibdico-fosfotungstico – 10 minutos
12. Agua destilada – 1 lavado
13. Eliminar sobrante
14. Solución de anilina – 15 minutos
15. Agua destilada – 1 lavado
16. Ácido acético glacial al 1% - 5 minutos
17. Deshidratar
18. Xilol – 10 minutos, dos veces
19. Montar – gota de resina sobre el cubreobjeto, dejar secar y observar

Bibliografía citada

- Abd J.M.A., Razak K.A., Hadi H. 2017. Stingless bee honey, the natural wound healer: a review. *Skin pharmacology and physiology*. 30: 66-75.
- Alves D.F.S., Cabral F.D.C., Cabral P.P.D.A., De Olivera R.M., Do Rego A.C., Medeiros A.C. 2008. Effects of topical application of the honey of *Melipona subnitida* in infected wounds of rats. *Revista del colegio brasileiro de cirujanos*. 35(3): 188-193.
- Alquisira R.E.V. 2019. La importancia de la meliponicultura en México. En: Roman (Ed.). *Prácticas agropecuarias como estrategias de seguridad alimentaria*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, pp. 104-129.
- Avella D.M.G., García C.A.O. Cisneros A.M. 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. En: memorias del simposio de metrología. Universidad Autónoma de Querétaro. Disponible en: https://www.cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/M2/SM2008-M220-1108.pdf. Fecha de acceso: enero 2021.
- Ávila S., Beux A.R., Ribani R.H., Zambiasi C.R. 2018. Stingless bee honey: quality parameters, bioactive compounds, health-promotion properties and modification detection strategies. *Trends in food and science technology*. 81: 31-50.
- Ayala R., González V.H., Engel M.S. 2012. Mexican stingless bees (Hymenoptera: Apidae): diversity, distribution and indigenous knowledge. En: Vit P., Pedro S., Roubik D. (Eds.). *Pot-Honey*. Springer. New York, pp. 135-152.
- Bedascarrasbure E., Maldonado L., Álvarez A. Rodríguez E. 2004. Contenido de fenoles y flavonoides de propóleos argentinos. *Acta farmacéutica bonaerense*. 23(3): 369-372.
- BioRender. Herramienta para la ilustración científica. Disponible en: <https://biorender.com/>

- Bogdanov S., Martin P., Lullmann C. 2002. Harmonized methods of the international honey commission. International Honey Commission. Disponible en: <https://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf>. Fecha de acceso: diciembre 2020.
- Bogdanov S. 2016. Honey composition. In: Book of honey. Chapter 5. *Bee product science*. Disponible en: <https://www.bee-hexagon.net/english/bee-products/downloads-honey-book/>. Fecha de acceso: febrero 2021.
- Cáceres F., Herrera G., Fernández A., Fernández J., Martínez R., Carvajal D., Haidar Z.S. 2017. Utilidad de tinción de tricrómico de Masson en la cuantificación de densidad media vascular en mucosa oral normal, displasia epitelial y carcinoma oral de células escamosas. *International journal of morphology*. 35(4): 1576-1581.
- Cano-Contreras E.J., Martínez-Martínez C., Balboa-Aguilar C.C. 2013. La “abeja del monte” (Insecta: Apidae, Meliponini) de los choles de Tacotalpa, Tabasco: conocimiento local, presente y futuro. *Etnobiología*. 11(2): 47-57.
- Canul-Heredia C., Nah-Naal M.I., Rosado C.J., Martínez-Puc J.F., Cetzal-Ix W., García-Juárez G.D. 2017. Importancia del rescate y la conservación de la meliponicultura en la península de Yucatán, México. En: Martínez P., Martínez P.J., Cetzal I.W. (Eds.). *Apicultura: manejo, nutrición, sanidad y flora apícola*. Universidad Autónoma de Campeche. Campeche, pp. 104-111.
- Caprette R.D. 2015. Experimental biosciences, resources for introductory and intermediate level laboratory courses. Disponible en: <https://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/bradford.html>. Fecha de acceso: febrero 2021.
- Catzín V.G.A., Alfaro B.R., Medina M.L.A., Delgado H.M.A. 2009. Actividad antimicrobiana y origen botánico en mieles de *Melipona beecheii*, *Scaptotrigona pectoralis* y *Apis mellifera* del estado de Yucatán. En: Yurrita O.C. (Ed.). *Memorias VI congreso mesoamericano sobre abejas nativas*. Universidad de san Carlos Guatemala. Guatemala, pp. 86-92.

- Cauich K.R., Ruiz R.J.C., Ortíz V.E., Segura C.M.R. 2015. Potencial antioxidante de la miel de *Melipona beecheii* y su relación con la salud: una revisión. *Nutrición hospitalaria*. 32(4): 1432-1442.
- Chan R.D., Ramón S.J., Lope A.J., Sauri D.E., Cuevas G.L., Ortiz V.E. 2012. Antibacterial properties of honey produced by *Melipona beecheii* and *Apis mellifera* against foodborne microorganisms. *Food science and biotechnology*. 21(3): 905-909.
- Ciappini M.C., Stoppani F.S., Martinet R., Alvarez M.B. 2013. Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucalipto y alfalfa. *Revista de ciencia y tecnología*. 15(19): 45-51
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2012. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. Tech. Rep. M100-S22*, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Pennsylvania, USA, 184 p.
- Contreras-Oliva A., Pérez-Sato J.A., Gómez-Merino F.C., López-Garay L.A., Villanueva-Gutiérrez R., Crosby-Galván M.M., Trejo-Téllez L.I. 2018. Characterization of *Scaptotrigona mexicana* pot-pollen from Veracruz, México. In: *Pot-Pollen in stingless bee mellittology*. Springer. Cham. pp. 325-337.
- Dardón M.J. y Enríquez E. 2008. Caracterización fisicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (Meliponini) de Guatemala. *Interciencia*. 33(12): 916-922.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2017. NOM-003-SAG/GAN-2017, "Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento". Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5500103&fecha=06/10/2017.
Fecha de acceso: febrero 2021.

- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2020. NOM-004-SAG/GAN-2018 “Producción de miel y especificaciones”. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5592435&fecha=29/04/2020. Fecha de acceso: octubre 2020.
- Díaz A.R.C. y Fernández R.D. 1998. Determinación de algunos parámetros de calidad de la miel en la provincia de Huesca. *Lucas Mallada: revista de ciencias*. (10): 107-122.
- Espinoza-Toledo C., Vázquez-Ovando A., Torres de los Santos R., López-García A., Albores-Flores V., Grajales-Conesa J. 2018. Stingless bee honeys from Soconusco, Chiapas: a complementary approach. *Revista de biología tropical*. 66(4): 1536-1546.
- Esteva E. 2006. El tratamiento de las heridas. *Offarm*. 25(8): 54-60.
- Fernández L.A. y Gallez L.M. 2008. Calidad microbiológica de las mieles del sistema serrano de Ventania. *Revista agroUNS*. 5(9): 18-21.
- Grajales-Conesa J., Vandame R., Santiesteban-Hernández A., López-García A., Guzmán-Díaz M. 2018. Propiedades fisicoquímicas y antibacterianas de mieles de abejas sin aguijón del Sur de Chiapas, México. *Ibciencias*. 1(1): 1-7.
- Guarín C.C., Quiroga S.P., Landínez P.N.S. 2013. Proceso de cicatrización de heridas de piel, campos endógenos y su relación con las heridas crónicas. *Revista de la facultad de medicina*. 61(4): 441-448.
- Guija-Poma E., Inocente-Camones M.A., Ponce-Pardo J., Zarzosa-Norabuena E. 2015. Evaluación de la técnica 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte médico*. 15(1): 57-60.
- Haryanto R.N., Urai T., Mukai K., Suriadi R.N., Sugama J., Nakatani T. 2012. Effectiveness of indonesian honey on the acceleration of cutaneous wound healing: an experimental study in mice. *Wounds*. 24(4): 110-119.

- Hawk C.T., Leary S.L., Morris T.H. 1999. Formulary for laboratory animals. Iowa State University Press. pp. 887-895.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 1989. Papantla cuaderno de información básica para la planeación municipal. México. pp. 22.
- Jagota S.K. y Dani H.M. 1982. A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using Folin phenol reagent. *Analytical biochemistry*. 127:178-182.
- Jiménez M., Beristain C.I., Azuara E., Remedios M.M., Pascual L.A. 2016. Physicochemical and antioxidant properties of honey from *Scaptotrigona mexicana* bee. *Journal of apicultural research*. 55(2): 151-160.
- Jiménez-Díaz J. 2019. *Propiedades químicas de la miel producida por Scaptotrigona mexicana (Guérin-Meneville) (Apidae: Meliponini) y su importancia socioeconómica para los meliponicultores de Cuetzalan y San Antonio Rayón, Puebla*. Tesis de maestría, Instituto de ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. 84 p.
- Kimoto-Nira H. y Amano K. 2008. Antimicrobial activity of honey produced by stingless honey bees. *Journal of apicultural research and bee world*. 47(4): 325-327.
- Lullah-Deh J.A., Khan M.E., Eneji I.S. 2018. Physicochemical characteristics of honey samples from Mambilla Plateau, Nigeria. *Journal of biomaterials*. 2(1): 7-11.
- Marks R. y Motley R. 2012. Cicatrización de heridas y úlceras. En: Morales S.J.L. y Uriza G.T. (Eds.). *Dermatología*. El manual moderno, pp. 182-183.
- Márquez L.J. 1994. Meliponicultura en México. *Dugesiana*. 1(1): 3-12.
- Medeiros V.D.F.L.P., Azevedo I.M. Rego A.C.M. Egito E.S.T.D. Araújo-Filho I. Medeiros A.C. 2016. Antibacterial properties and healing effects of *Melipona*

scutellaris honey in MRSA-infected wounds of rats. *Acta cirurgica brasileira*. 31(5): 327-332.

- Mengarelli H.R., Bilevich E., Belatti A., Cevallos M.V., Gorosito S. 2013. Antisépticos y heridas crónicas. *Actualizaciones terapéuticas dermatológicas*. 36: 234-239.
- Moo H.V.M., Sauri D.E., Moo H.M., López P.M.E. 2015. Calidad de la miel de abejas sin aguijón, una revisión. En: Congreso internacional "CUCCAL" sociedad mexicana de inocuidad y calidad para consumidores de alimentos. *Sobre inocuidad, calidad, funcionalidad de alimentos en la industria y servicios de alimentación*. México. pp. 100-109.
- Nordin A., Omar N., Sainik V.N.Q.A., Chowdhury R.S., Omar E., Saim B.A., Idrus B.H.R. 2018. Low dose stingless bee honey increases viability of human dermal fibroblasts that could potentially promote wound healing. *Wound medicine*. 23: 22-27.
- Nufio-Oliva M.S. 2018. *Comparación del efecto cicatrizante de la miel de abeja maya (Melipona beecheii) versus la miel de abeja melífera (Apis mellifera) en heridas post-castración en conejos (Oryctolagus cuniculus)*. Tesis de licenciatura en médico veterinario, Facultad de medicina veterinaria y zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 77 p.
- Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO). 2015. Miel de abeja. *Revista del consumidor*. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/100347/RC456_Estudio_Calidad_de_Miel_de_Abejas.pdf. Fecha de acceso: octubre 2020.
- Puig S.L. 2014. Anatomía y fisiología de la piel humana. En: Ferrándiz C. (Ed.). *Dermatología clínica*. Elviesier España S.L., pp. 1-9.
- Reyes G.A. Camou G.A., Reyes S.O., Arguera A., Casas A. 2014. Diversity, local knowledge and use of stingless bees (Apidae: Meliponini) in the municipality of

Nocupétaro, Michoacan, México. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*. 10(47): 1-12.

- Reyes G.A., Camou G.A., Gómez A.S. 2016. From extraction to meliponiculture: a case study of the management of stingless bees in the west-central region of Mexico. En: Dechechi C.E. (Ed.). *Beekeeping and bee conservation*. IntechOpen. Londres, pp. 201-223.
- Rodríguez E., Gamboa M., Hernández F., García J. 2005. *Bacteriología general principios y prácticas de laboratorio*. Editorial de la Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- Ruíz-Ruíz J.C., Matus-Basto A.J., Acereto-Escoffié P., Segura-Campos M.R. 2017. Antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolic compounds isolated from *Melipona beecheii* honey. *Food and agricultural immunology*. 28(6): 1424-1437.
- Sadasivam S. y Manickam A. 1996. *Biochemical methods*. Second edition. New age of international (P), India. 256 p.
- Salas J., Tello V., Zavaleta A., Villegas L., Salas M., Fernández I., Vaisberg A. 1994. Actividad cicatrizante del latex de *Jatropha curcas* (Angiospermae: Euforbiaceae). *Revista de biología tropical*. 42: 323–326.
- Salazar L. y Moreno F. 2016. Comparación de tres tipos de tinciones histoquímicas en secciones de paladar y lengua de rata Wistar. *Salutem scientia spiritus*. 2(2):12-23.
- Salazar-Vargas H., Pérez-Sato J.A., Debernardi-De La Vequia H., Real-Luna N., Hidalgo-Contreras J.V., De la Rosa-Santamaría R. 2017. Meliponario para la crianza de abejas sin aguijón (*Scaptotrigona mexicana* Guérin-Meneville). *Agroproductividad*. 10(1): 73-79.

- Salem Z.C., Pérez P.J.A., Henning L.E., Uherek P.F., Schultz O.C., Butte B.J.M., González F.P. 2000. Heridas Conceptos generales. *Cuadernos de cirugía*. 14(1): 90-99.
- Santos-Vidal S. 2017. *Tinción Hematoxilina-Eosina*. Tesis de maestría en ciencia y tecnología química, Facultad de ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia, España. Disponible en: <http://e-spacio.uned.es/fez/view/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Ssantos>. Fecha de acceso: enero 2021.
- Schencke C., Vásquez B., Sandoval C., Del Sol M. 2016. El rol de la miel en los procesos morfofisiológicos de reparación de heridas. *International journal of morphology*. 34(1): 385-395.
- Suárez-Moreno D.X. 2003. *Guía de procesos para la elaboración de néctares, mermeladas, uvas pasas y vinos*. Convenio Andrés Bello, Bogotá. 40 p.
- Suescún L. y Vit P. 2008. Control de calidad de la miel de abejas producida como propuesta para un proyecto de servicio comunitario obligatorio. *Fuerza farmacéutica*. 12(1): 6-15.
- Vásquez D.M.A. y Hipólito H.E. 2011. Uso múltiple de los productos de la abeja nativa *Melipona beecheii* entre los yoko t'anob en Tabasco, México. En: Memorias del 7° seminario mesoamericano sobre abejas nativas. *Unión de cooperativas tosepan*. Ecosur. Cuetzalan, Puebla, México, pp. 51-54.
- Visweswara R.P., Thevan K.K., Salleh N., Hua G.S. 2016. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. *Revista brasileira de farmacognosia*. 26: 657-664.
- Vit P., Medina M., Enríquez M.E. 2004. Quality standars for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *Bee world*. 85(1): 2-5.

- Wang H. y Bun T.N. 2002. Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry*. 61(1): 1-6.
- Woisky R.G. y Salatino A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of apicultural research*. 37(2): 99-105.