



**Universidad Nacional Autónoma de México**

---

---

**Facultad de Estudios Superiores Iztacala**

**Unidad de Biotecnología y Prototipos**

**Laboratorio de Farmacognosia**

*“Actividad antimicrobiana de dos muestras de miel:  
Miel de Eucalipto de la Cuenca del Papaloapan,  
Oaxaca y Miel de Cítricos y Azahar del Municipio de  
Soledad de Doblado, Veracruz.”*

**T E S I S**

Para obtener el título de

**B I Ó L O G A**

**PRESENTA:**

**RODRÍGUEZ GARCÍA JESSICA**

**DIRECTORA:**

**DRA. MA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ**

Tlalnepantla de Baz, Edo. México.

2023.





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **Reconocimiento**

Este trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Fue dirigido por la Doctora Ma. Margarita Canales Martínez y revisado por el jurado conformado por:

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy.

Dr. Mario Rodríguez Canales.

Dra. Ana Bertha Hernández Hernández.

Mtro. Luis Barbo Hernández Portilla.

## **Agradecimientos**

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

A la Dra. Margarita Canales, mi directora de tesis, por guiarme durante todo este proceso con paciencia y cariño, por transmitir su conocimiento con tanto empeño y dedicación.

A la Dra. Ana Hernández por su ayuda y paciencia durante toda mi estancia dentro del laboratorio, por su calidez y simpatía.

Al Dr. Marco Aurelio por orientarme y retroalimentar mi trabajo siempre con la amabilidad que le caracteriza.

Al equipo conformado por los laboratorios de Farmacognosia e Inmunología, particularmente a Uriel, Jimena, Kenneth, Marlene, Toño, Pili y Bauma por brindarme su apoyo y consejo cuando me fue necesario. Y en especial a Sofia y Mikel por los errores y aciertos compartidos, por las risas incontables que hicieron de este camino uno más ameno y divertido.

## **Dedicatorias**

A Emilia García Olivera, mi Tita, por ser ejemplo en mi vida de trabajo duro, sacrificio y resiliencia. Gracias por apoyarme, quererme y cuidarme.

A Maribel García García, mi madre, por compartir mis horas de desvelo y su compañía día con día. Gracias por la fortaleza que tuviste cuando ambas lo necesitábamos, por sacarme adelante sola y siempre estar de manera incondicional a pesar de nuestras diferencias.

A Ma. de la Luz Rodríguez Flores, mi madrina, por cumplir la promesa de estar presente en mi vida, por su cariño y preocupación.

A Wendy Pacheco García, mi hermana y amiga, gracias por compartir tu vida conmigo, por las aventuras y los enojos, por los consejos y confidencias.

A mis mascotas, Mateo, Espuma, Tomasa (Chiqui), Luna, Red, Sirius y Minerva, por hacerme tan feliz sin siquiera saberlo.

Y a ti Jessica, por quedarte aun cuando todo estaba oscuro, por tu esfuerzo y el logro que esto significa.

## Índice de contenido

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción .....	3
1.1 Bacterias .....	3
1.2 Antibióticos y resistencia bacteriana.....	4
1.2.1 Bacterias Gram positivas y resistencia .....	6
1.1.2 Bacterias Gram negativas y resistencia .....	7
1.3 Miel y actividad antimicrobiana.....	8
1.4 Situación de la miel en México .....	9
1.5 Problemáticas en torno a la miel .....	10
1.6 Normatividad.....	10
2. Objetivos.....	11
2.1 Objetivo general. ....	11
2.2 Objetivos particulares.....	11
3. Materiales y métodos.....	12
3.1 Obtención y origen de las muestras de miel.....	12
3.2 Propiedades organolépticas.....	12
3.3 Propiedades fisicoquímicas.....	13
4. Resultados.....	17
5. Discusión .....	30

6. Conclusiones.....	36
7. Apéndices .....	37
Apéndice I.....	37
Apéndice II.....	38
Apéndice III.....	40
Apéndice IV .....	41
Apéndice V.....	43
Apéndice VI .....	45
Apéndice VII.....	47
8. Referencias .....	49

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Mecanismo de acción de algunos antibióticos. ....	5
Cuadro 2. Propiedades organolépticas y fisicoquímicas de la miel de eucalipto y la miel de cítricos y azahar. ....	17
Cuadro 3. Resultados de las pruebas cualitativas para la detección de metabolitos secundarios..	18
Cuadro 4. Metabolitos secundarios y nutrientes. ....	26
Cuadro 5. Actividad antimicrobiana inhibitoria de las mieles.....	27
Cuadro 6. Curva de calibración de ácido gálico. ....	37
Cuadro 7. Curva de calibración de quercetina. ....	39
Cuadro 8. Curva de calibración de atropina.....	41
Cuadro 9. STOCK 2 (20 µl/180 µl).....	42
Cuadro 10. STOCK 1 de (10 g/5 ml).....	42
Cuadro 11. Curva de calibración de glucosa. ....	44
Cuadro 12. Curva de calibración de albúmina.....	46
Cuadro 13. Curva de calibración de ácido ascórbico.....	48

## Índice de figuras

Figura 1. Estructura de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	4
Figura 2. Miel de eucalipto y miel de cítricos y azahar .....	18
Figura 3. Pruebas cualitativas para fenoles, flavonoides, alcaloides con reactivo Mayer y alcaloides con reactivo Dragendorff (tubo rotulado JAID y con precipitado negro).....	18
Figura 5. Curva patrón de ácido gálico y absorbancias interpoladas.....	19
Figura 6. Reacción colorimétrica de las muestras de miel con el cloruro de aluminio y la curva de quercetina a la derecha.....	20
Figura 7. Curva patrón de quercetina y absorbancias interpoladas .....	20
Figura 8. Reacción colorimétrica de la reducción del DPPH con la quercetina. ....	21
Figura 9. Reacción colorimétrica de la reducción del DPPH con las muestras de miel.....	21
Figura 10. Capacidad antioxidante media (CAOM) de la miel de eucalipto.....	22
Figura 11. Capacidad antioxidante media (CAOM) de la miel de cítricos y azahar .....	22
Figura 12. Curva de glucosa y reacción de las muestras de miel .....	23
Figura 13. Curva patrón de glucosa y absorbancias interpoladas.....	23
Figura 14. Reacción con el reactivo de Bradford con las muestras de miel.....	24
Figura 15. Curva patrón de albúmina y absorbancias interpoladas .....	24
Figura 16. Curva de ácido ascórbico e interpolación de absorbancias de las mieles.....	25
Figura 17. Cajas Petri que muestran la inhibición de las mieles sobre las diferentes cepas bacterianas.....	28
Figura 18. Actividad antimicrobiana inhibitoria de las mieles .....	29
Figura 19. Mecanismo de acción del reactivo Folin-Ciocalteu. ....	37
Figura 20. Curva de fenoles totales.....	38

Figura 21. Estructura del complejo <b><i>AlCl<sub>3</sub></i></b> – flavonoide.....	39
Figura 22. Curva de flavonoides totales. ....	40
Figura 23. Curva de alcaloides totales. ....	41
Figura 24. Estructura del DPPH y su reducción por un antioxidante .....	42
Figura 25. Curva de reducción DPPH.....	43
Figura 26. Reacción de la glucosa con el reactivo Nelson-Somogy.....	44
Figura 27. Curva de carbohidratos.....	45
Figura 28. Reacción de las proteínas con el reactivo de Bradford.....	46
Figura 29. Curva de proteínas.....	47
Figura 30. Estructura de la Vitamina C (ácido ascórbico).....	47
Figura 31. Curva patrón de Vitamina C.....	48

## Resumen

Las bacterias son microorganismos procariontes que pueden clasificarse en Gram positivos y Gram negativos; algunas de ellas son patógenas y causan enfermedades infecciosas de importancia médica. Para combatirlas se han utilizado antibióticos, que inhiben o matan a estos microorganismos; desafortunadamente su uso inadecuado ha provocado resistencia bacteriana. Este fenómeno ha generado la necesidad de buscar nuevas alternativas de combate contra estos microbios, siendo una de estas opciones la miel.

La miel es la sustancia natural, dulce producida por las abejas de la especie *Apis mellifera*. Cuenta con distintas características organolépticas y parámetros fisicoquímicos que le proporcionan propiedades antimicrobianas. Su actividad antimicrobiana se ha demostrado en diversos estudios en donde ha inhibido cerca de 60 diferentes especies bacteriana, incluyendo gramnegativas y grampositivas.

Es por ello que se determinaron las propiedades organolépticas y antibacterianas, así como la composición fisicoquímica de dos muestras de miel: la Miel de Eucalipto de la Cuenca del Papaloapan, Oaxaca y la Miel de Cítricos y azahar del Municipio de Soledad de Doblado, Veracruz. Se obtuvo que ambas muestras se encuentran dentro de lo establecido por la Norma Oficial Mexicana y la literatura citada; la actividad antibacteriana fue evaluada sobre diferentes cepas tanto Gram negativas como Gram positivas, obteniendo halos de inhibición que indican distinto grado de sensibilidad. Finalmente, la miel de eucalipto tuvo mayor actividad antimicrobiana respecto a la de cítricos y azahar.

**Palabras clave:** miel, bacterias, resistencia bacteriana, actividad antibacteriana, fisicoquímica.

## Abstract

Bacteria are prokaryotic microorganisms classified as Gram-positive and Gram-negative; some are pathogenic and cause infectious diseases of medical importance. Antibiotics have been used to combat them, inhibiting or killing these microorganisms; unfortunately, their inappropriate use has caused bacterial resistance. This phenomenon has generated the need to look for new alternatives to combat these microbes, including the honey.

Honey is the natural, sweet substance produced by bees of the species *Apis mellifera*. It has different organoleptic characteristics and physicochemical parameters that provide it with antimicrobial properties. Its antimicrobial activity has been demonstrated in various studies where it has inhibited about 60 different bacterial species, including gram-negative and gram-positive.

That is why the organoleptic and antibacterial properties, as well as the physicochemical composition of two honey samples were determined: Eucalyptus Honey from the Papaloapan Basin, Oaxaca, and Citrus and Orange Blossom Honey from the Municipality of Soledad de Doblado, Veracruz. It was obtained that both samples are within what is established by the Official Mexican Standard and the cited literature; the antibacterial activity was evaluated on different strains, both Gram-negative and Gram-positive, obtaining inhibition zones that indicate different degrees of sensitivity. Finally, Eucalyptus honey had greater antimicrobial activity compared to Citrus and Orange Blossom honey.

**Keywords:** honey, bacteria, bacterial resistance, antibacterial activity, physical chemistry.

## **1. Introducción**

### **1.1 Bacterias**

Las bacterias son microorganismos unicelulares (0.5 - 5  $\mu\text{m}$ ) pertenecientes al grupo de los procariontes. Se caracterizan por no poseer núcleo ni organelos membranosos, en algunos casos presentan cápsula, flagelos y fimbrias; cuentan también con una pared celular constituida por peptidoglicanos que les proporciona resistencia y protección contra el medio externo. A pesar de su sencilla constitución, las bacterias tienen una gran diversidad de formas como cocos, bacilos y espirilos, que se reproducen o dividen mediante fisión binaria a una velocidad promedio de entre 15-30 minutos. La mayoría de ellas son de vida libre, aunque existen algunas que son de vida intracelular obligada (Sánchez *et al.*, 2017).

Para estudiar su clasificación y morfología existen distintos métodos, uno de ellos, la tinción Gram. Esta técnica fue desarrollada en 1884 por el médico danés Hans Christian Gram, mediante la observación de bacterias y su tinción con cristal violeta, lugol y safranina, en tejidos pulmonares de pacientes infectados con neumonía. Diferenció a las bacterias en dos grandes grupos de acuerdo con la estructura de su pared celular y la retención de las tinciones: 1) Bacterias Gram positivas con pared celular gruesa formada por peptidoglicanos y polímeros que le proporcionan impermeabilidad, permitiendo que se retenga la tinción azul-violeta y 2) Bacterias Gram negativas con pared compuesta por una capa delgada de peptidoglicano y una bicapa de lipoproteínas que se decoloran y se tiñen con safranina (Rodríguez y Arenas, 2018).



**Figura 1.** Estructura de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Recuperado de “Diferenciando Bacterias Gram Positivo (+) y Gram Negativo (-) Mediante Tinción de Gram” por Morales, 2018.

## 1.2 Antibióticos y resistencia bacteriana

Las bacterias se encuentran en casi todos los ambientes (aire, tierra, agua) y pueden presentarse en algunos alimentos o vivir en simbiosis con plantas y animales. Sin embargo, también existen bacterias patógenas que causan enfermedades infecciosas que son de importancia médica para el humano; el cólera, la malaria, la tuberculosis, la gripe, la neumonía y la gastroenteritis son algunas de ellas. Para combatirlas se han utilizado, desde su descubrimiento, sustancias químicas llamadas antibióticos, que se producen de forma natural o semisintética, que causan la inhibición (efecto bacteriostático) o muerte (efecto bactericida) de estos microorganismos (Paredes y Roca, 2004).

Los antibióticos pueden clasificarse de acuerdo con su estructura química o su mecanismo de acción ya sea sobre la pared bacteriana, la membrana celular, las enzimas involucradas en reacciones metabólicas y la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Por su estructura se dividen en  $\beta$ -lactámicos, los glicopéptidos, los aminoglucósidos, las quinolonas, lactonas macrocíclicas, las polimixinas, los macrólidos, las tetraciclinas, las sulfamidas, el cloranfenicol, la fosfomicina, etc. La clasificación de acuerdo con su mecanismo de acción se muestra en el Cuadro 1.:

**Cuadro 1.** Mecanismo de acción de algunos antibióticos.

<b>Antibiótico</b>	<b>Mecanismo</b>
*Penicilina	Inhiben las enzimas de transpeptidización que participan en la formación de los enlaces entre las cadenas de polisacáridos del peptidoglicano y activan enzimas líticas de la pared bacteriana.
*Meticilina	
*Cefalosporinas	
*Vancomicina	Se une a la región D-Ala-D-Ala del tetrapéptido de las cadenas de glicanos por lo que inhibe la reacción de transpeptidización.
•Estreptomicina	Interaccionan con la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis proteica y provocando la lectura errónea del ARNm.
•Gentamicina	
•Cloranfenicol (derivado benzoico)	Interacciona con la subunidad 50S del ribosoma bacteriano; inhibe a la peptidiltransferasa bloqueando la formación del enlace peptídico.
•Ciprofloxacina	Inhibe a la ADN girasa bacteriana interfiriendo en la replicación del ADN y en la transcripción.
°Sulfamidas	Inhiben la síntesis de ácido fólico compitiendo con el ácido-p-aminobenzoico.
°Trimetoprima	Bacteriostático inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa, bloqueando la síntesis del tetrahidrofolato.
+Polimixina B	Se une a la membrana, alterando su estructura y sus propiedades de permeabilidad.

\*Inhibidores de la síntesis de la pared celular; •Inhibidores de la síntesis proteica; •Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos; °Antagonistas metabólicos; +Alteradores de la membrana celular (Lizarbe, 2009).

El uso terapéutico inadecuado de estos químicos, su implementación en la ganadería y la agricultura y su progresiva liberación al ambiente, así como la disminución en el desarrollo y aprobación de nuevas sustancias, ha generado lo que se conoce como resistencia bacteriana. La resistencia bacteriana se define como la capacidad que tienen las bacterias de soportar los efectos de los antibióticos destinados a controlarlas o eliminarlas, derivada de mutaciones en su ADN y producto de un proceso adaptativo (Esteva *et al.*, 2011).

### **1.2.1 Bacterias Gram positivas y resistencia**

#### ***Staphylococcus aureus***

Coco agrupado en racimos,  $\beta$  hemolítico, catalasa y coagulasa positivo. Se describe como parte del microbioma humano encontrándose principalmente en la piel, en la zona nasofaríngea, pliegues inguinales y axilas; sin embargo, también tiene acción patógena. Es conocida como la principal bacteria nosocomial causante de infecciones en la piel y tejidos blandos (músculos, tendones, tejidos grasos y vasos sanguíneos), invasión en dispositivos médicos y relevante en enfermedades transmitidas por alimentos. Esto se debe a su resistencia, que presenta mecanismos como la formación de biopelícula, la acción de MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) o el Factor clumping, y causa que la interacción con antibióticos como la penicilina, la meticilina y vancomicina no sea adecuada (Pasachova *et al.*, 2019).

#### ***Staphylococcus epidermidis***

Coco coagulasa negativo, considerado patógeno importante en la generación de infecciones urinarias intrahospitalarias, osteomielitis, endocarditis de válvula nativa, bacteriemia en pacientes inmunosuprimidos, endoftalmitis después de cirugía ocular e infecciones de dispositivos médicos. Esto se debe a la formación de 'biofilm' a partir de ácido teicoico, que lo protege de la acción de

los neutrófilos y disminuye la penetración de antibióticos (metecilina y vancomicina) (García-Apac *et al.*, 2003).

### ***Enterococcus faecalis***

Coco catalasa negativo, anaerobio facultativo que forma parte de la microbiota intestinal y genitourinaria humana. A pesar de su baja virulencia han cobrado importancia como patógenos nosocomiales causantes de infecciones del tracto urinario, intraabdominales, pélvicas, de la piel y tejidos blandos, bacteriemia y endocarditis principalmente en paciente inmunosuprimidos. Este organismo ha generado resistencia a varios antibióticos (vancomicina y penicilina) lo que dificulta su tratamiento (Acosta-Gnass, 2005).

### **1.1.2 Bacterias Gram negativas y resistencia**

#### ***Pseudomonas aeruginosa***

Bacilo móvil, aerobio, oxidasa positivo con disposición individual, en pares o encadenas cortas; forma colonias redondas y lisas de color verde fluorescente, debido a la producción de piocianina o pioverdina. Produce afecciones intrahospitalarias como infección en heridas y quemaduras generando pus verde azulado, meningitis cuando se introduce por punción lumbar, infecciones urinarias al introducirse por catéteres u otros instrumentos, neumonía necrosante al presentarse en respiradores contaminados, otitis, infección ocular y septicemia en casos graves de pacientes inmunosuprimidos. Su tratamiento consiste en el uso de penicilina, cefalosporinas y ciprofloxacina (Brooks *et al.*, 2011).

#### ***Escherichia coli***

Bacilo anaerobio facultativo, oxidasa negativo que coloniza el intestino humano y se considera parte de su microbiota normal, pero que tiene cepas patógenas causantes de cuadros clínicos como la diarrea, infecciones urinarias, meningitis e incluso sepsis. Su tratamiento se basa en el uso de

penicilina, cefalosporinas, sulfamidas, ciprofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol (Rodríguez-Ángeles, 2002; Brooks *et al.*, 2011).

La resistencia bacteriana, aunada a los altos costos de los medicamentos modernos y la desigualdad que desfavorece su obtención en distintos sectores de la población, son un fenómeno que representa en la actualidad un problema de salud pública importante y ha generado la necesidad de buscar nuevas alternativas para combatir a estos microbios; entre ellas existen opciones que utilizan plantas medicinales y productos de la colmena, como el polen, el propóleo, la jalea real y la miel.

### **1.3 Miel y actividad antimicrobiana**

La miel se define como la sustancia natural, dulce, producida por abejas de la especie *Apis mellifera* a partir de néctar de las flores, secreciones de partes vivas de las plantas o excreciones de ciertos insectos succionadores (Hemíptera). Las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias (enzimas como la invertasa) estos sustratos; los depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que maduren, añejen y finalmente se produzca la miel (FAO, 1981).

La miel tiene distintos parámetros físicos entre los que se encuentran el color, el pH, la humedad, la densidad, la conductividad eléctrica e incluso el sabor. Así mismo, contiene diversos compuestos químicos de interés como vitaminas, enzimas, aminoácidos, minerales y ácidos grasos, una importante cantidad de agua y azúcares (95 a 99%) entre los que destacan la fructosa y la glucosa, así como ácidos fenólicos, flavonoides y antioxidantes. Tanto las propiedades físicas como la composición química dependen de la ubicación geográfica, las condiciones climáticas y el tipo de vegetación de donde las abejas toman el néctar (Otero-Salinas *et al.*, 2018).

Mediante la apicultura, la miel ha sido utilizada y aprovechada por los humanos desde tiempos remotos como alimento y edulcorante; en la industria cosmética por sus propiedades calmantes, demulcentes, epitelizantes, emolientes, hidratantes, refrescantes y tonificantes. Tiene también aplicaciones médicas, ya sea consumiéndola o aplicándola exteriormente, en el tratamiento de heridas, úlceras, quemaduras en la piel y otras afecciones, por sus propiedades antisépticas, cicatrizantes, antiinflamatorias y antimicrobianas (González *et al.*, 2013).

La actividad antimicrobiana de la miel se ha demostrado en diversos estudios, en donde se han inhibido cerca de 60 diferentes especies bacterianas, incluyendo Gram positivas y Gram negativas, algunas levaduras, especies de hongos como *Aspergillus* y *Penicillium*, así como dermatofitos comunes. Esto principalmente por su pH ácido (en promedio 3.9), una alta osmolaridad y una actividad de agua baja (entre 0.56 y 0.62 Aw), a la presencia de ácidos aromáticos y volátiles, metabolitos secundarios, y a la producción de peróxido de hidrógeno asociada con la enzima glucosa oxidasa (Zamora y Arias, 2011).

#### **1.4 Situación de la miel en México**

En México la apicultura y la miel son de gran relevancia en el sector pecuario, especialmente en el medio rural, debido a la importante fuente de empleos, ingresos y divisas que genera, particularmente para pequeños productores, que tienen la actividad como complementaria en sus unidades agroforestales. La región sureste del país es la más importante para la producción de miel; ésta se centra en los estados de Yucatán, Campeche, Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Tabasco y Puebla (Ramos y Pacheco, 2016).

México es el octavo productor a nivel mundial, con 57 mil 995 toneladas de miel en promedio por año; la mitad de esta producción se consume a nivel nacional (300 gramos anuales per cápita). En términos de exportaciones es el tercer mayor exportador, solo después de China y Argentina,

enviando al extranjero alrededor de 34 mil toneladas anuales generando un ingreso promedio de 124 millones de dólares (periodo 2014-2018); los destinos principales Estados Unidos, Alemania, Bélgica, Arabia Saudita y Reino Unido (INEGI, 2021).

### **1.5 Problemáticas en torno a la miel**

La situación de supervivencia actual de las abejas, la producción de miel y los beneficios que de ella pueden obtenerse, no sólo en México sino a nivel mundial, es preocupante debido a diferentes problemáticas como la aparición de enfermedades, el cambio climático y el uso de pesticidas. Las abejas, al igual que otros organismos, son susceptibles a enfermedades, parásitos y plagas que pueden tener un efecto nocivo en el desarrollo y productividad de las colonias; las principales afecciones son la varroosis, loque americana y europea, cría de cal, nosemosis, acarosis y parálisis (Guzmán y Correa, 2012). El cambio climático, por otro lado, podría impactar negativamente en la apicultura de forma directa sobre la respuesta intra e interespecífica de la flora melífera y las abejas, o de forma indirecta enfocado a las afectaciones socioeconómicas de los apicultores por los riesgos de producción y la incertidumbre que conlleva (Castellanos-Potenciano, *et al.*, 2016). Finalmente, el uso excesivo de pesticidas y agroquímicos que buscan potenciar el rendimiento de monocultivos tecnificados ha generado la drástica disminución en las poblaciones de abejas, reportando al mismo tiempo la contaminación de la miel con compuestos que afectan no sólo la inocuidad del alimento, sino también la salud de los consumidores (Martin-Culma y Arenas-Suárez, 2018).

### **1.6 Normatividad**

Existen diversos instrumentos normativos que tienen como objetivo regular la producción, sanidad y comercialización de los productos de las abejas en México; el principal, la Norma Oficial Mexicana NOM-004-SAG/GAN-2018. En ella se establecen las características generales para la

producción de miel que propicien el cuidado y desarrollo de las abejas melíferas, así como las especificaciones que esta debe cumplir para su comercialización, favoreciendo la actividad apícola y la competitividad (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2020).

Por lo antes expuesto, en este trabajo de investigación se plantean los siguientes objetivos.

## **2. Objetivos.**

### **2.1 Objetivo general.**

Determinar la composición fisicoquímica y las propiedades antibacterianas de dos muestras de miel.

### **2.2 Objetivos particulares.**

Para las muestras de miel:

- 1- Determinar las propiedades organolépticas (color, sabor, olor y consistencia).
- 2- Cuantificar las propiedades físicas: densidad, porcentaje de humedad, grados Brix (porcentaje de sólidos) y ángulo de rotación.
- 3- Cuantificar las propiedades químicas: pH, concentración de carbohidratos reductores, proteínas, vitamina C, fructosa, fenoles, flavonoides, alcaloides y capacidad antioxidante media.
- 4- Evaluar su actividad antimicrobiana en cepas de:
  - Bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *Enterococcus faecalis*.
  - Bacterias Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli*.

### **3. Materiales y métodos.**

#### **3.1 Obtención y origen de las muestras de miel.**

Se utilizaron dos muestras de miel provenientes de distintas localidades dentro de la República Mexicana; estas fueron extraídas, procesadas, envasadas, donadas y nombradas por los apicultores, para su posterior transporte al laboratorio de Farmacognosia, en la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FES Iztacala.

La primera de ellas, la Miel de Eucalipto, es proveniente de la Cuenca del Papaloapan, Oaxaca. En la región predominan los climas cálido húmedo, semicálido húmedo y templado húmedo, con temperatura promedio entre 18-50°C. Esta cuenta con una vegetación de tipo selva baja caducifolia con presencia de eucaliptos y suelo destinado a la agricultura (Gobierno del Estado de Oaxaca, 2020).

La segunda, la Miel de Cítricos y azahar, es proveniente del Municipio de Soledad de Doblado, Veracruz. El lugar cuenta con clima cálido subhúmedo, con un rango de temperatura de entre 24-26°C y humedad de 47-53%. La vegetación es de tipo selva baja caducifolia, pastizales y suelo destinado a la agricultura (SIEGVER, 2021).

#### **3.2 Propiedades organolépticas.**

La preparación, así como la determinación de las propiedades organolépticas y fisicoquímicas de ambas muestras de miel, se evaluó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-004-SAG/GAN-2018.

Las propiedades organolépticas se determinaron con la participación de 7 evaluadores, miembros del laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FES Iztacala.

La consistencia se evaluó colocando 10 g de miel en un vaso de precipitados y se observó si fluía fácilmente por sus paredes o si permanecía inmóvil en el fondo; así mismo se determinó si era o no visible la cristalización de sus componentes para clasificarla como fluida, viscosa, parcial o totalmente cristalizada.

Para conocer el sabor se colocaron 10 g de miel en un vaso de precipitados, con una cuchara se tomó un poco y se dejó disolver en la boca permitiendo percibir el sabor y otras sensaciones. Se dejaron pasar 30 minutos entre muestra y muestra, considerando que los evaluadores debieron abstenerse de fumar, usar pasta dental u otros productos de limpieza o aromatización bucal.

El olor de las muestras se determinó colocando 10 g de miel en un vaso de precipitados, mismos que se giraron para permitir la liberación de sustancias volátiles; posteriormente se inhaló durante unos segundos sobre la superficie del vaso y se evaluó el olor.

El color fue observado por los evaluadores, directamente de las muestras colocadas en un vaso de precipitados.

### **3.3 Propiedades fisicoquímicas.**

El color se determinó y comprobó con lo dicho por los evaluadores, utilizando un fotómetro para análisis de miel marca Hanna modelo HI 96785, que se calibró con glicerol grado analítico. Las lecturas se compararon en función de los mm en la escala de Pfund.

La densidad absoluta se evaluó por técnica convencional, pesando en una balanza analítica 5 ml de miel, para posteriormente aplicar la siguiente fórmula:

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

La humedad, los grados Brix, el ángulo de rotación y el porcentaje de fructosa se midieron con un refracto-polarímetro portátil marca ATAGO modelo RePo-4.

Para el pH se disolvieron 10 g de miel en 75 ml de agua y se utilizó un potenciómetro.

Se realizaron pruebas cualitativas para indicar la presencia-ausencia de metabolitos secundarios en la miel de eucalipto; para determinar la presencia de fenoles se utilizó  $\text{FeCl}_3$ , para flavonoides  $\text{AlCl}_3$  y para alcaloides se utilizaron los reactivos Dragendorff y Mayer. Una vez detectada la presencia de los metabolitos secundarios, se procedió a realizar su cuantificación.

Para la determinación cuantitativa de fenoles se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu y una solución estándar de ácido gálico (0.2 mg/ml) para realizar una curva patrón (Apéndice I). Las muestras problema se prepararon con 300 mg de miel diluidas en 1 ml de agua destilada; de ellas se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  más 700  $\mu\text{l}$  agua destilada, 50  $\mu\text{l}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu y 150  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Después de 2 horas de reacción a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan Sky. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de miel (mg eAG/g) (Singleton *et al.*, 1999).

Se realizó para los flavonoides una curva patrón de quercetina y cloruro de aluminio al 2% (Apéndice II). Las soluciones problema se prepararon con una concentración de 600 mg de miel en 3 ml de MeOH grado HPLC, tomando una alícuota de 1 ml y agregando 1 ml de  $\text{AlCl}_3$ . Después de 10 minutos de reacción, se midió la absorbancia con el espectrofotómetro a 450 nm y se expresaron los resultados como microgramos equivalentes de quercetina por gramo de miel ( $\mu\text{g}$  eQ/g) (Ramamoorthy y Bono, 2007).

Los alcaloides se determinaron con una curva patrón de atropina (Apéndice III). De las muestras de miel se disolvió 1 g en 5 ml de agua; de esta solución se tomaron 1.2 ml y se le agregaron 5 ml de fosfato de sodio 2 M y 5 ml de verde de bromocresol. Posteriormente se realizaron tres lavados con cloroformo (1 ml – 1.5 ml – 2 ml) y se recuperó la fase clorofórmica

con ayuda de pipetas Pasteur; finalmente se determinó la absorbancia a 470 nm (Shamsa *et al.*, 2008).

La capacidad antioxidante se evaluó mediante el método de reducción del radical DPPH, donde se realizó una curva patrón de quercetina (Apéndice IV). De las muestras de miel se tomaron 10 mg que se disolvieron en 5 ml de MeOH grado HPLC (STOCK 1); del STOK 1 se tomaron 20  $\mu$ l y se agregaron 180  $\mu$ l más de MeOH (STOCK 2) realizándose después un gradiente de concentraciones. Se tomaron por triplicado 50  $\mu$ l de cada concentración y se agregaron 150  $\mu$ l de la solución metanólica de DPPH a 0.004 g/100 ml de metanol (100  $\mu$ M), se incubaron por 30 minutos en la oscuridad a 37°C. Finalmente se midió la absorbancia de las reacciones a 540 nm (Okusa *et al.*, 2007).

Los carbohidratos se extrajeron tomando 10 mg de miel para diluirlos en 1 ml de etanol al 80 %, se enfriaron en baño de hielo durante 15 min y se centrifugaron a 10000 rpm por 15 minutos; se recuperó el sobrenadante y se secó al vacío. La cuantificación se realizó con el método Nelson-Somogyi, utilizando una curva patrón de glucosa 200  $\mu$ l/ml como referencia (Apéndice V). Las muestras se resuspendieron en 5 ml de agua, tomando después 1 ml de cada una y agregando 1 ml de reactivo de cobre; se llevaron a baño María por 20 minutos, se enfriaron con agua corriente, se agregó 1 ml de arsenomolibdato y 7.5 ml de agua destilada y finalmente fueron leídas a 540 nm en un espectrofotómetro (González y Peñalosa, 2000).

Las proteínas se extrajeron pesando de 100 mg de miel que se diluyeron en 2 ml de una mezcla de MeOH-cloroformo-agua (12:5:3) y homogenizando en un baño de hielo. Las preparaciones se centrifugaron a 4500 rpm por 10 minutos repetidamente hasta que el color dejó de apreciarse; se recuperó la fase acuosa y se secó al vacío. La cuantificación se hizo mediante el método de Bradford (Apéndice VI); las muestras se resuspendieron en 1 ml de agua, se tomaron 500  $\mu$ l de

cada una, se agregaron 500  $\mu$ l del reactivo y se leyeron a 595 nm en un espectrofotómetro junto a una curva patrón de albúmina 100  $\mu$ g/ml (González y Peñalosa, 2000).

Para la Vitamina C se tomó 1 g de miel, se agregaron 4 ml de ácido tricloroacético al 10% para después homogeneizarse y colocarse en un baño de hielo por 5 minutos. La mezcla se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos, y una vez finalizado se decantó el sobrenadante, del cual se tomaron alícuotas de 20, 30, 40 y 50  $\mu$ l, a las que se agregaron 20  $\mu$ l del reactivo Folin-Ciocalteu y se leyeron en el espectrofotómetro a 760 nm junto con la una curva de ácido ascórbico 1mg/10ml (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70  $\mu$ g/ml) (Apéndice VII) (González y Peñalosa, 2000).

La evaluación antimicrobiana se realizó con especies de bacterias Gram positivas y Gram negativas de interés clínico, disponibles en el cepario del laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos. Para el inóculo se utilizó medio de cultivo Müller-Hinton; con un asa de siembra estéril se tocó la superficie convexa de 4 o 5 colonias y se sumergió en 10 ml de caldo. El tubo se incubó a 35°C durante un periodo de 18 a 24 horas y finalmente se ajustó el cultivo a una turbidez equivalente al estándar No. 0.5 de McFarland, aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml (CLSI, 2019). La actividad inhibitoria se hizo una vez sembradas las cepas bacterianas, a través del método de difusión en agar Kirby-Baüer haciendo pozos en el agar con la boquilla de pipetas Pasteur estériles y llenando directamente con la miel; como control se utilizaron sensidiscos con Cloranfenicol (25  $\mu$ g). Se dejaron incubar por 24 horas a 35°C y los halos de inhibición se midieron con una regla calibrada en milímetros.

Finalmente se realizó un análisis de varianza con un factor y un  $\alpha$  de 0.01 en aquellas cepas que tuvieron sensibilidad de acuerdo con la escala de Duraffourd, utilizando Microsoft Excel para Microsoft 365 MSO (versión 2309 compilación 16.0.16827.20014) de 64 bits.

#### 4. Resultados

Las propiedades organolépticas y fisicoquímicas obtenidas de las dos muestras de miel se presentan en el Cuadro 2.:

**Cuadro 2.** Propiedades organolépticas y fisicoquímicas de la miel de eucalipto y la miel de cítricos y azahar.

<i>Característica</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>
Color	Ámbar	Ámbar
Sabor	PV*	PV*
Olor	PV*	PV*
Consistencia	Viscosa	Fluida
Color (Pfund)	Ámbar	Ámbar claro
Densidad (g/ml)	1.44	1.06
Humedad (%)	14.20	18.20
Ángulo de rotación	-1.62	-4.11
Grados Brix	82.60	79.80
pH	4.00	4.48
Fructosa (g/100g)	55.00	53.70

M1: miel de eucalipto, M2: miel de cítricos y azahar.

\*PV: propio de la vegetación.



**Figura 2.** Miel de eucalipto (izquierda) y miel de cítricos y azahar (derecha).

Las pruebas cualitativas para la miel de eucalipto se muestran en el Cuadro 3 y en la Figura 3.

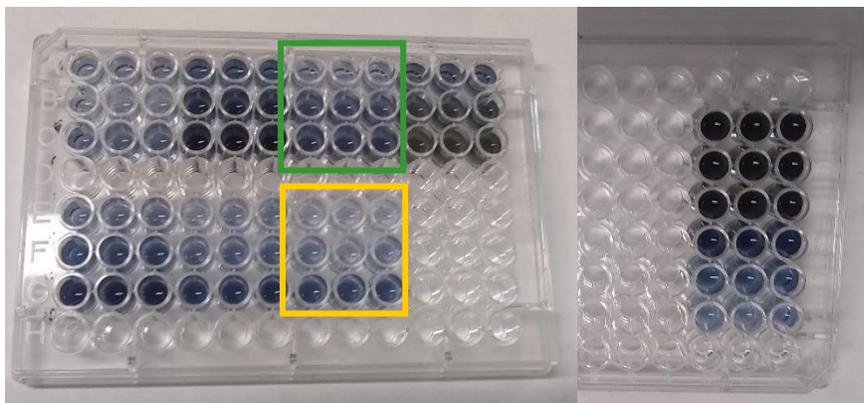
**Cuadro 3.** Resultados de las pruebas cualitativas para la detección de metabolitos secundarios.

<i>Metabolito</i>	<i>Resultado</i>
Fenoles	Positivo
Flavonoides	Positivo
Alcaloides	Positivo

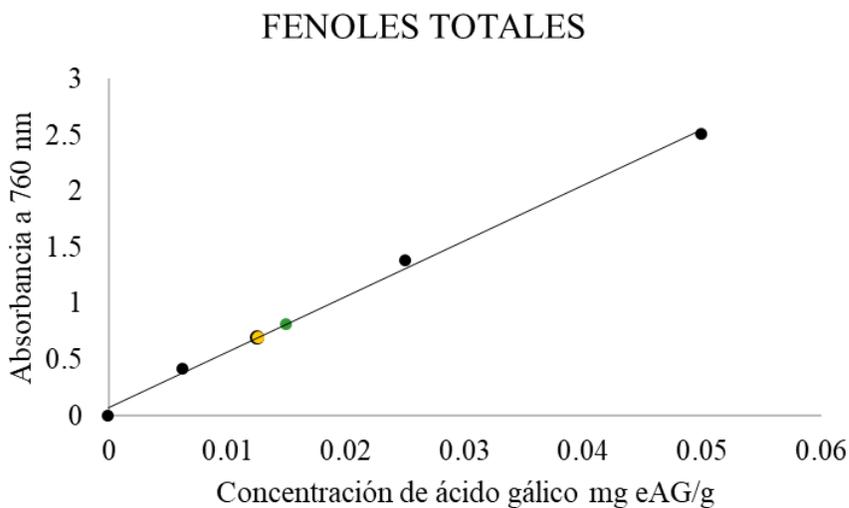


**Figura 3.** Pruebas cualitativas para fenoles (tubo rotulado JFe), flavonoides (tubo rotulado JFla), alcaloides con reactivo Mayer (tubo rotulado JAIM) y alcaloides con reactivo Dragendorff (tubo rotulado JAID y con precipitado negro).

Los resultados positivos en las pruebas cualitativas permitieron iniciar la cuantificación de los metabolitos secundarios. Para la cuantificación de fenoles totales, se realizó una curva patrón con ácido gálico como estándar de referencia (Figura 4). Se interpolaron las absorbancias de las muestras de miel en la ecuación de la recta, obteniéndose que la miel de eucalipto contiene 50 mg eAG/100 g y la miel de cítricos y azahar 42 mg eAG/100g (Figura 5).

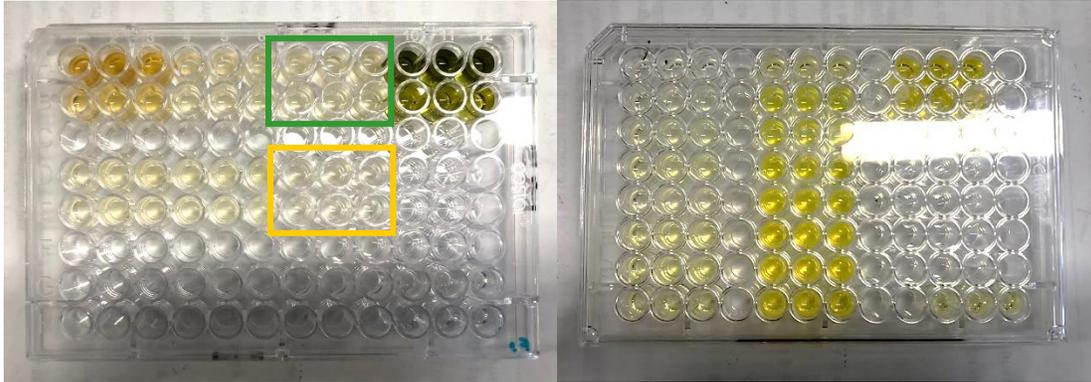


**Figura 4.** Reacción colorimétrica del reactivo Folin-Ciocalteu con las muestras de miel (en verde la miel de eucalipto y en amarillo la miel de cítricos y azahar) y curva de ácido gálico a la derecha.

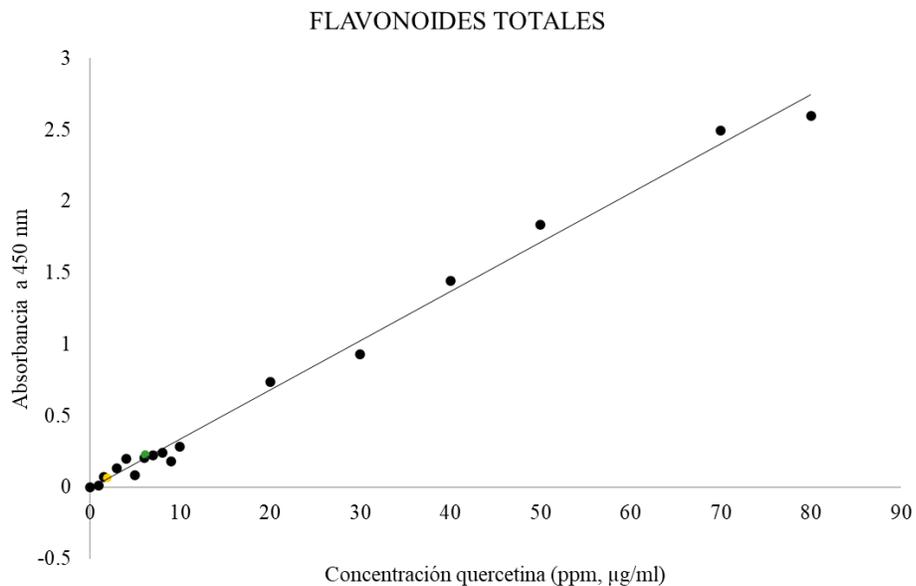


**Figura 5.** Curva patrón de ácido gálico y absorbancias interpoladas de la miel de eucalipto (verde) y miel de cítricos y azahar (amarillo).

Los flavonoides se cuantificaron realizando una curva patrón de quercetina y cloruro de aluminio al 2% (Figura 6). Las absorbancias se interpolaron dando como resultado 3.07 mg eQ/100 g para la miel de eucalipto y 0.79 mg eQ/100 g para la miel de cítricos y azahar (Figura 7).



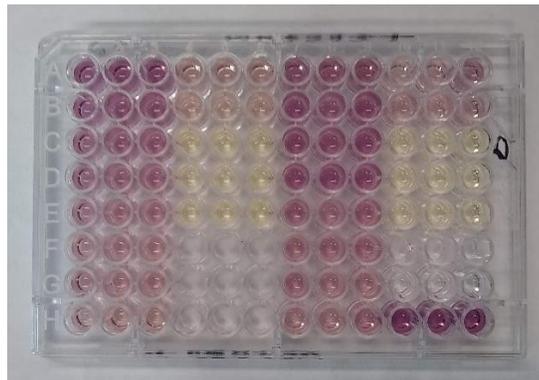
**Figura 6.** Reacción colorimétrica de las muestras de miel con el cloruro de aluminio (en verde la miel de eucalipto y en amarillo la miel de cítricos y azahar) y la curva de quercetina a la derecha.



**Figura 7.** Curva patrón de quercetina y absorbancias interpoladas de la miel de eucalipto (verde) y miel de cítricos y azahar (amarillo).

La concentración de alcaloides fue mínima, el valor de absorbancia (0.007) obtenida a 470 nm no pudo interpolarse en la curva patrón de atropina.

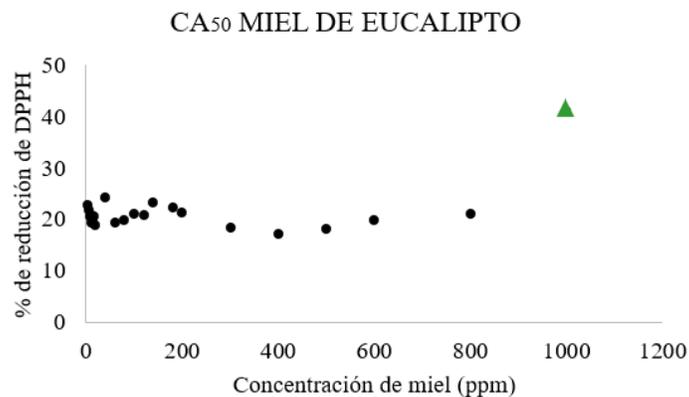
La capacidad antioxidante se cuantificó con una curva patrón de quercetina como referencia (Figura 8). Las absorbancias obtenidas, derivadas de la reducción del DPPH y su concentración a 1 mg/1 ml, se interpolaron y el resultado indicó 41.12% para la miel de eucalipto (Figura 9 y 10) y 31.43% para la miel de cítricos y azahar (Figura 9 y 11).



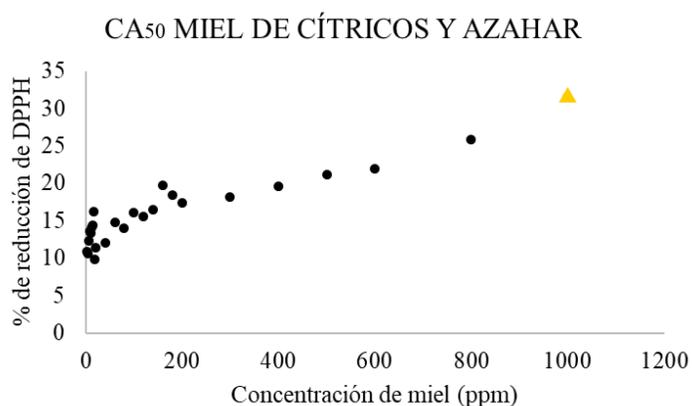
**Figura 8.** Reacción colorimétrica de la reducción del DPPH con la quercetina.



**Figura 9.** Reacción colorimétrica de la reducción del DPPH con la miel de eucalipto (izquierda) y miel de cítricos y azahar (derecha).

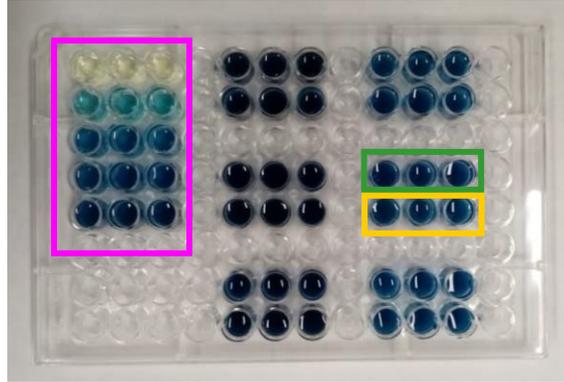


**Figura 10.** Capacidad antioxidante media (CA<sub>50</sub>) de la miel de eucalipto, con el mayor valor de reducción en verde.

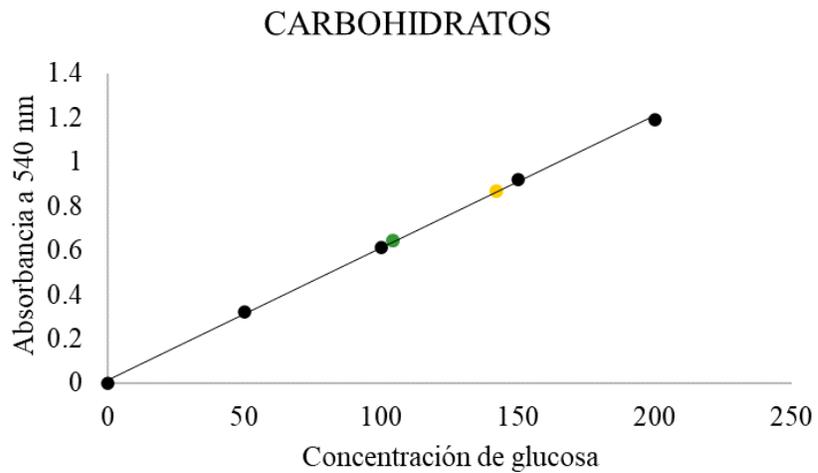


**Figura 11.** Capacidad antioxidante media (CA<sub>50</sub>) de la miel de cítricos y azahar, con el mayor valor de reducción en amarillo.

Los carbohidratos se cuantificaron realizando una curva patrón de glucosa como referencia (Figura 12); las absorbancias obtenidas fueron interpoladas dando como resultado 52.32% de carbohidratos reductores para la miel de eucalipto y 71.32 para la miel de cítricos y azahar (Figura 13).

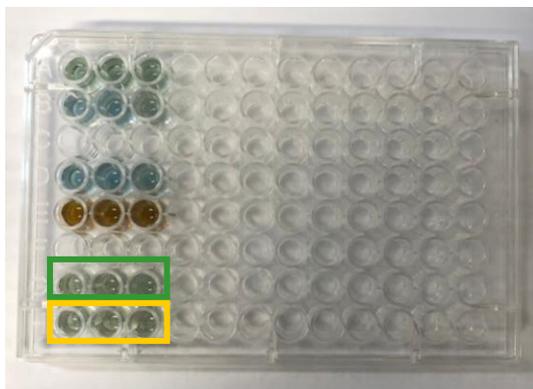


**Figura 12.** Curva de glucosa (rosa) y reacción de las mieles de eucalipto (verde) y cítricos y azahar (amarillo) con el reactivo Nelson-Somogyi.

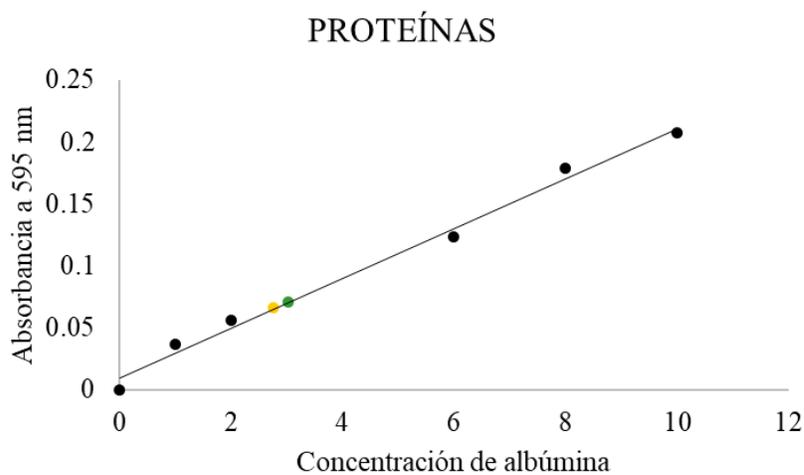


**Figura 13.** Curva patrón de glucosa y absorbancias interpoladas de la miel de eucalipto (verde) y miel de cítricos y azahar (amarillo).

Para la cuantificación de proteínas se utilizó una curva patrón con albúmina como referencia; las absorbancias fueron interpoladas y se obtuvo 0.02% para la miel de eucalipto y 0.01 para la miel de cítricos y azahar (Figura 14 y 15).

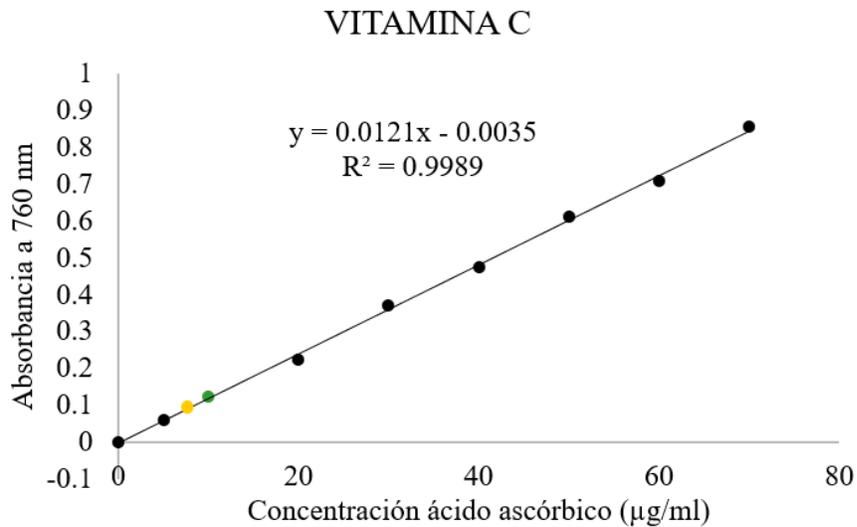


**Figura 14.** Reacción con el reactivo de Bradford con la miel de eucalipto (verde) y la miel de cítricos y azahar (amarillo).



**Figura 15.** Curva patrón de albúmina y absorbancias interpoladas de la miel de eucalipto (verde) y miel de cítricos y azahar (amarillo).

La Vitamina C se cuantificó realizando una curva patrón de ácido gálico. Se interpolaron las absorbancias y se obtuvo una concentración de 81.52 mg de Vitamina C para la miel de eucalipto y 59.76 mg de Vitamina C para la miel de cítricos y azahar (Figura 16).



**Figura 16.** Curva de ácido ascórbico e interpolación de absorbancias de la miel de eucalipto (verde) y miel de cítricos y azahar (amarillo).

Las pruebas cuantitativas y los valores obtenidos en la determinación de fenoles totales, flavonoides, capacidad antioxidante, porcentaje de proteínas y contenido de Vitamina C, se muestran condensados en el Cuadro 4.:

**Cuadro 4.** Metabolitos secundarios y nutrientes.

<i>Característica</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>
Fenoles (mg)	50.00	42.00
Flavonoides (mg)	3.07	0.79
Capacidad antioxidante (%)	41.12	31.43
Carbohidratos (%)	52.32	71.32
Proteínas (%)	0.02	0.01
Vitamina C (mg)	81.52	59.76

Los valores expresados están dados en función de 100 g de miel.

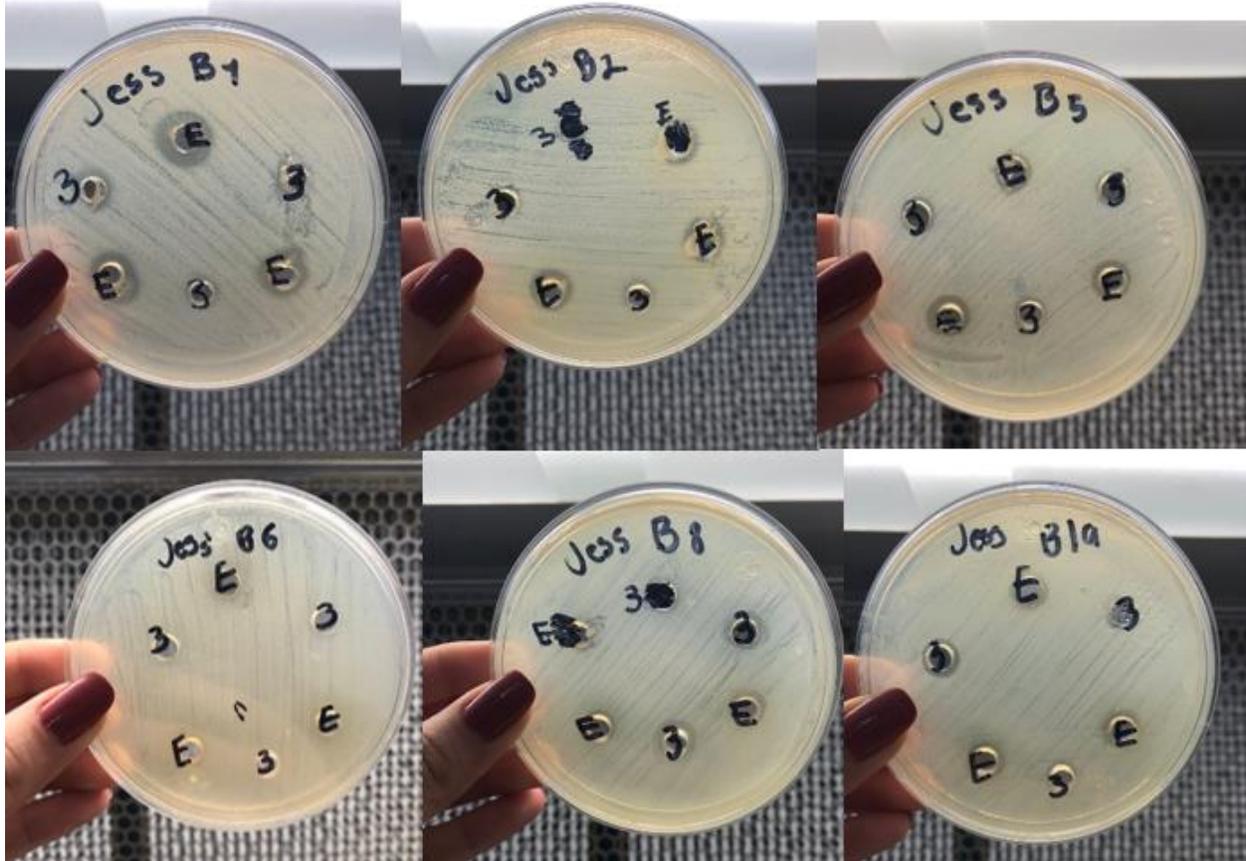
El % de reducción del DPPH fue a 1000 ppm para cada muestra.

Los valores de inhibición de la miel pura sobre diversos microorganismos Gram positivos y negativos, obtenidos gracias al método de difusión en agar Kirby-Baüer y a la medición de halos, se presentan en el Cuadro 5, Figuras 17 y 18. Del mismo modo se observan los datos del control (Cloranfenicol):

**Cuadro 5.** Actividad antimicrobiana (Halos de inhibición) de las muestras de miel. Los valores de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano están dados en milímetros (mm), se obtuvo el promedio de tres repeticiones con su respectiva desviación estándar y se compararon con la Escala de Duraffourd propuesta en 1987: Nula (-) < 8 mm, Sensible (+) 8 a 14 mm, Muy sensible (++) 14 a 20 mm y Sumamente sensible (+++) > 20 mm.

\*NA: no activo.

<b>Organismo</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>Cloranfenicol</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> CDBB-1044	11.66 ± 1.15	8.50 ± 0.70	21.66
<i>Staphylococcus aureus</i> caso clínico	10.00 ± 1.00	7.00 ± 0.50	30.33
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC-12228	9.66 ± 1.15	8.00 ± 1.00	10.33
<i>Enterococcus faecalis</i> CDBB-B-1533	NA*	NA*	20.33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CDBB-B-999	10.00 ± 1.41	9.66 ± 1.52	18.33
<i>Escherichia coli</i> caso clínico	9.00 ± 1.00	7.66 ± 1.15	24.33

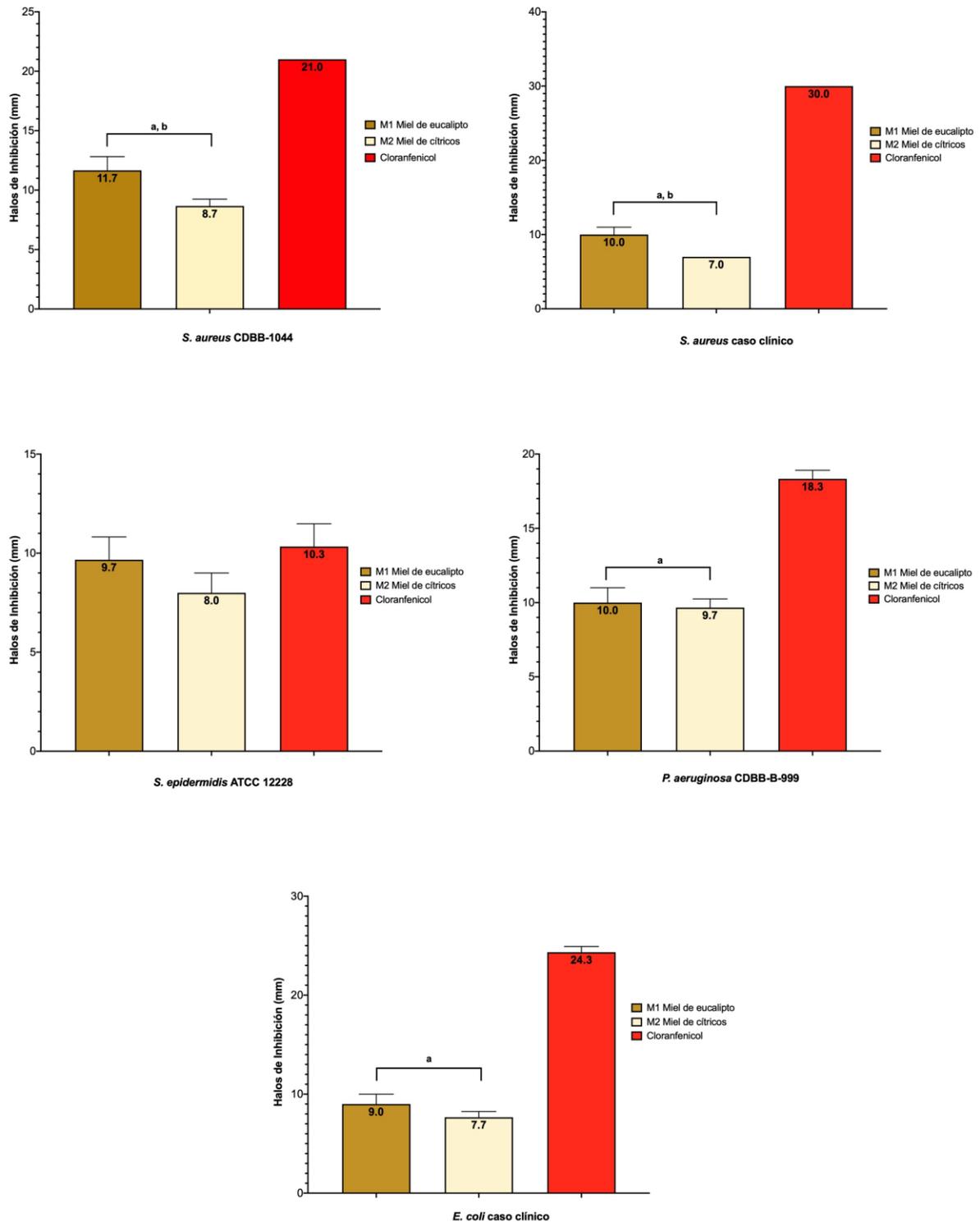


**Figura 17.** Halos de inhibición formados por la acción de las mieles. B1: *S. aureus* CDBB-1044; B2: *S. aureus* caso clínico; B5: *S. epidermidis* ATCC 12228; B6: *E. faecalis* CDBB-B-1533; B8: *P. aeruginosa* CDBB-B-999; B19: *E. coli* caso clínico.

\*E: miel de eucalipto.

\*3: miel de cítricos y azahar.

Estos mismos resultados fueron graficados y pueden observarse en la Figura 18.



**Figura 18.** Actividad antimicrobiana inhibitoria de las mieles. Las barras representan el promedio de los milímetros medidos en los halos inhibitorios y sus desviaciones estándar.

El análisis de varianza (ANOVA de una vía), realizado para los halos de inhibición sobre *S. aureus* CDBB-1044, demostró que existen diferencias significativas entre las mieles y el control positivo (P- 0.0001) siendo mayores los halos de inhibición del Cloranfenicol; también se demostró que hay diferencias significativas en los halos de inhibición entre mieles, siendo la miel de eucalipto la que mostró halos de mayor diámetro (P- 0.0063) (Figura 18). El mismo comportamiento se observó en *S. aureus* caso clínico, hay diferencias significativas entre las mieles y el control positivo (P- 0.0001) y en los halos de inhibición entre mieles (P- 0.0017).

Respecto a *S. epidermidis*, se determinó que no existen diferencias significativas para ninguna de las mieles, aunque se observó que, de las dos, la de eucalipto mostró diámetros mayores.

Finalmente, ambas mieles mostraron diferencias significativas respecto al Cloranfenicol, sobre *P. aeruginosa* y *E. coli*; comparando las mieles entre sí, no se observaron diferencias significativas, sin embargo, la tendencia de la miel de eucalipto fue la de mostrar halos de mayor tamaño.

### **Discusión**

Las características organolépticas (color, olor, sabor y consistencia) son las que se perciben por medio de los sentidos; para la miel estas son importantes a nivel comercial y se relacionan directamente con su origen y manejo. Las muestras de miel analizadas cumplen con las características establecidas por la NOM-004-SAG/GAN-2018 en donde se indica que la miel debe presentarse como una sustancia fluida, viscosa, total o parcialmente cristalizada, sin olores, sabores o colores extraños absorbidos de materias externas. De acuerdo con los evaluadores ambas mieles presentaron sabor y olor propio de la vegetación, y la consistencia de la miel de eucalipto fue viscosa y la de cítricos y azahar fue fluida (Cuadro 2). Esto representa, en primera instancia, un correcto manejo productivo (Gallez, 2006).

El color descrito por los evaluadores para las dos mieles fue ámbar; esto pudo comprobarse al comparar las muestras con la escala Pfound en donde la miel de eucalipto obtuvo un color ámbar y la miel de cítricos y azahar un color ámbar claro. Mendoza-Bacilio y colaboradores en 2022, reportaron una fuerte correlación entre el color y el contenido de fenoles, flavonoides y la capacidad antioxidante en mieles de Guerrero, siendo mayores los valores en mieles oscuras, lo que coloca a este parámetro como importante para una evaluación inicial de estos compuestos.

La densidad y la humedad (Cuadro 2) también se encuentran dentro de los parámetros determinados por NOM-004-SAG/GAN-2018; para la densidad se establece mínimo 1.410 g/ml y máximo 1.435 g/ml, mientras que la humedad no debe sobrepasar el 20%. La miel de eucalipto tuvo una densidad de 1.44 g/ml y una humedad de 14.20; la miel de cítricos y azahar una densidad de 1.06 g/ml y una humedad de 18.20 (Cuadro 2). Valores menores de densidad y mayores de humedad, indicarían la falta de madurez de las mieles, lo que favorecerían el desarrollo de microorganismos fermentadores que liberan alcohol etílico,  $CO_2$  y ácido acético, provocando que la miel no sea apta para el consumo (SAGARPA, 2018).

Los azúcares representan del 95 al 99% de la materia seca de la miel y se relacionan directamente con la densidad y la humedad. Los monosacáridos glucosa y fructosa son los más abundantes (85-95%) y de acuerdo con la norma la suma de ambas debe ser mínimo de 60g/100g. Los grados Brix son una variable que se utiliza para evaluar el porcentaje de azúcares totales; en la miel debe haber de 70 a 88 grados Brix. Para estas variables, ambas muestras de miel se encuentran dentro de lo establecido, la miel de eucalipto con 82.60 grados Brix y 55.00 g de fructosa, mientras que la miel de cítricos y azahar 79.80 grados Brix y 53.70 g de fructosa (Cuadro 2) (Lino, 2002).

La miel tiene un pH de 3.5–4.5, esta acidez se debe a la presencia de ácidos orgánicos. La miel de Eucalipto con 4.00 y la miel de Cítricos y azahar con 4.48 (Cuadro 2) se encuentran dentro de los parámetros antes mencionados, infiriéndose que el ácido glucónico es el que se encuentra en mayor proporción, debido a que es el más común en las mieles siendo el producto de la reacción enzimática de la glucosa-oxidasa (López, 2014).

Los fenoles son compuestos químicos, derivados de la fenilalanina, y en menor proporción de la tirosina, conformados por un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Estos contribuyen a la capacidad antioxidante y se ha reportado también su actividad antimicrobiana, de manera más efectiva sobre especies Gram positivas, debido a que destruyen la pared y la membrana bacteriana e inactivan sistemas enzimáticos (Soriano, 2020).

Los fenoles totales cuantificados en 30 mg de muestra tuvieron un valor de 0.015 mg eAG para la miel de eucalipto y 0.0126 mg eAG para la miel de cítricos y azahar (Figura 5); al realizar las respectivas equivalencias para 100 g de miel se obtuvieron 50.00 mg eAG para la miel de eucalipto y 42.00 mg eAG para la miel de cítricos y azahar (Cuadro 4). Ambas muestras coinciden con los valores reportados por Chávez-Borges y otros investigadores en 2019, cuyo rango varió entre los 16.61 y los 101.63 mg eAG/100 g de miel en diversas mieles colectadas en el estado de Hidalgo. De igual forma pueden ser comparados con los resultados obtenidos por Ávila en 2022, quien encontró de 44.54 a 55.86 mg eAG/ 100 g de miel en mieles provenientes de Quintana Roo.

Los flavonoides son compuestos fenólicos, conformados por dos anillos aromáticos ligados a través de un anillo de pirano. Tienen actividad antioxidante gracias a las propiedades redox de sus grupos hidroxilo y a sus diferencias estructurales. También presentan actividad antimicrobiana debido al daño que producen sobre la pared y la membrana bacteriana, así como la inhibición de

la síntesis de ácidos nucleicos, el metabolismo energético y las bombas de eflujo (relacionadas con la resistencia a antibióticos) (Martínez-Flores *et al.*, 2002; Zorzetto, 2015).

Balcázar-Cruz y colaboradores en 2019, reportaron que el contenido de flavonoides en mieles tabasqueñas osciló entre 7.325 y 18.876 mg eQ/100 g de miel. Estos resultados fueron comparados en el mismo estudio con los de Ciappini y colaboradores en 2013, quienes encontraron entre 1.42 y 17.75 mg eQ/ 100 g de miel en muestras italianas. Los flavonoides totales en 200 mg de muestra tuvieron un valor de 6.13  $\mu$ g eQ para la miel de eucalipto y 1.58  $\mu$ g para la miel de cítricos y azahar (Figura 7). Para 100 g tanto la miel de eucalipto con 3.07 mg eQ como la de cítricos y azahar con 0.79 mg eQ (Cuadro 4) presentan un contenido de flavonoides similar al reportado por estos autores.

La capacidad antioxidante media se define como el potencial de una sustancia o compuesto para inhibir o dificultar la oxidación de un sustrato, por acción de radicales libres, hasta en un 50% (Benítez-Estrada *et al.*, 2020). Rodríguez en 2012 determinó la capacidad antioxidante media, con el método DPPH, para mieles de Naranja, Cactáceas y Campanilla provenientes de distintos estados de la República Mexicana, con valores del 74%, 27% y 18.37% respectivamente. Estos porcentajes permiten localizar la capacidad antioxidante media de las mieles de eucalipto con 41.12% (Figura 10) y cítricos y azahar con 31.43 (Figura 11) dentro de este rango.

El contenido de proteínas se encuentra en pequeñas cantidades en la miel, de 0.1 – 0.5 %, y tienen origen tanto de las glándulas salivales de las abejas como de las plantas (néctar o polen); entre las más comunes se encuentran las albúminas, globulinas, proteasas y peptonas. El contenido de proteínas en 14.95 mg de muestra es de 3.02  $\mu$ g para la miel de eucalipto y de 2.77  $\mu$ g para la miel de cítricos y azahar (Figura 15). En 100 g de muestra hay 0.02 mg de proteína en la miel de eucalipto y 0.01 mg en la miel de cítricos y azahar, es decir 0.02 y 0.01% respectivamente (Cuadro

4); estos valores son inferiores a los reportados, lo que podría deberse a su origen (la proteína vegetal suele ser menor que la proveniente del sistema salival de las abejas), factores ambientales, almacenamiento prolongado o sobrecalentamiento (Chua y Chan, 2013; Almeida-Muradian *et al.*, 2013).

La Vitamina C posee propiedades antioxidantes importantes, al eliminar especies reactivas de oxígeno rápidamente; no obstante, también actúa como una molécula antibacteriana prooxidante. La concentración de Vitamina C de acuerdo con Majtan y colaboradores en 2020, tiene un rango de 0.34 – 75.9 mg/100g de miel, dependiendo del procesamiento de la miel y su origen botánico. El contenido de ácido ascórbico en 12.5 mg de muestra es de 10.19 µg para la miel de eucalipto y de 7.47 µg para la miel de cítricos y azahar (Figura 16). En 100 g la Vitamina C para la miel de eucalipto fue de 81.52 mg y de 59.76 mg en la de cítricos y azahar (Cuadro 4); la miel de cítricos se está dentro del intervalo, mientras que la miel de eucalipto tiene un valor superior.

La miel posee efectos bacteriostáticos y bactericidas, el primero depende principalmente de la concentración de la miel, mientras que el segundo de la concentración y el tiempo de acción; ambos son óptimos en mieles frescas y sin calentar. La sensibilidad bacteriana a la miel se ha reportado principalmente sobre microorganismos Gram positivos y negativos patógenos y de manera particular, sobre *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis* (Machado De-Melo *et al.*, 2018).

En 2003, Cabrera y colaboradores evaluaron la actividad antibacteriana de cuatro muestras de miel recolectadas en el estado de Zulia en distintas épocas del año (secas y lluvias), sobre algunas cepas bacterianas de origen clínico, entre ellas *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Los resultados en época seca, a una concentración máxima de la miel de 50% (p/v), mostraron halos de inhibición para *S. aureus* cercanos o iguales a 15 mm en todas las

muestras, y para *E. coli* entre 10 y 15 mm; en el caso de *P. aeruginosa* no se reportó inhibición con dos de las muestras, mientras que las dos restantes tuvieron valores cercanos a los 10 y 20 mm. Para la época de lluvias, se determinaron halos cercanos a 15 mm para *S. aureus*, y de 10 a 15 mm para *E. coli*; *P. aeruginosa* no reportó inhibición con una de las muestras y las restantes tuvieron valores entre 10 y 15 mm. En comparación, las mieles de eucalipto y cítricos y azahar puras tuvieron menor inhibición contra *S. aureus* y *E. coli*, pero valores cercanos o mayores a los reportados contra *P. aeruginosa* (Cuadro 5).

Pozo (2016) evaluó la actividad antimicrobiana de tres mieles sobre *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Los halos de inhibición de las mieles puras después de 8 horas de acción para *S. aureus* fueron de 9, 10 y 23 mm, mientras que para *S. epidermidis* 1, 15 y 18 mm. La miel de Eucalipto tuvo valores similares a los reportados sobre ambas cepas de *Staphylococcus*. Por su parte la miel de cítricos y azahar tuvo halos más pequeños para *S. aureus* pero halos similares para *S. epidermidis* (Cuadro 5).

Valle y colaboradores en 2019 reportaron la acción antibacteriana de miel de *Apis mellifera*, recolectada en la ermita localizada en la comunidad valle de la laguna de apoyo del departamento de Masaya, sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Enterococcus faecalis*. Los halos de inhibición formados, derivados del método Kirby-Baüer convencional (sensidiscos) y utilizando miel pura, fueron de 15 mm para *Staphylococcus aureus*, 12 mm para *Escherichia coli* y 13.5 para *Enterococcus faecalis*. Las mieles de eucalipto y cítricos y azahar obtuvieron halos con valores inferiores o incluso nulos (como en el caso de *E. faecalis*) (Cuadro 5).

La actividad antimicrobiana de la miel depende de distintos factores que se relacionan directamente con su origen botánico, geográfico y entomológico, de la aplicación de buenas prácticas agrícolas, el almacenamiento y la manipulación, la concentración, las cepas bacterianas

utilizadas y el tiempo de acción, así como las técnicas empleadas (Aguilera, 2009). Las mieles analizadas no rebasaron la acción del control (Cloranfenicol), sin embargo, al compararlas, la miel de eucalipto tuvo mayor actividad antimicrobiana respecto a la de cítricos y azahar. Esta presentó un color más oscuro, relacionado directamente con su mayor contenido de fenoles, flavonoides y Vitamina C, además de un pH y densidad menores.

## **5. Conclusiones**

Se determinaron las características organolépticas y la composición fisicoquímica de las dos muestras de miel donadas por los apicultores de dos regiones de la República Mexicana.

Los parámetros de ambas muestras se encontraron dentro de los establecido por la Norma Oficial Mexicana y la literatura consultada.

La actividad antibacteriana fue evaluada sobre diferentes cepas tanto Gram positivas como Gram negativas, obteniendo halos de inhibición que indican distinto grado de sensibilidad; *Enterococcus faecalis* fue la única cepa sobre la que no se generaron halos.

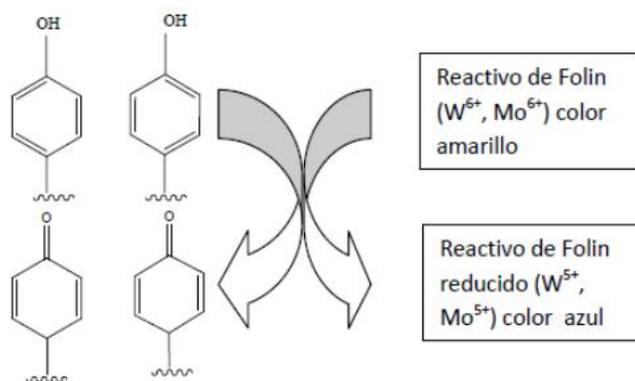
El análisis estadístico indicó diferencias significativas del control positivo y la miel de eucalipto en ambas cepas de *S. aureus*. Para en *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* y *E. coli* no se encontraron diferencias significativas para ningún tratamiento, no obstante, pudo observarse que la miel de eucalipto tuvo mayor actividad antimicrobiana respecto a la miel de cítricos y azahar.

Se recomienda realizar un análisis palinológico para determinar el origen floral y/o vegetal de las mieles, para así contar con más información sobre sus características.

## 6. Apéndices

### Apéndice I

La determinación de la concentración de fenoles totales (CFT) se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo Folin-Ciocalteu, dando una coloración azul que puede medirse espectrofotométricamente a 760 nm. El reactivo, amarillo y de pH ácido, contiene molibdato y tungstato sódico que tienen la capacidad de reaccionar con cualquier fenol para formar complejos fosfomolibdotúngsticos. La transferencia de electrones reduce estos complejos en óxidos y da lugar a una coloración azul intensa de tungsteno con pH básico; este color es proporcional al número de grupos hidroxilo de las moléculas. Para la expresión de resultados existen variaciones, sin embargo, en patrón recomendado es el ácido gálico (García *et al.*, 2015).

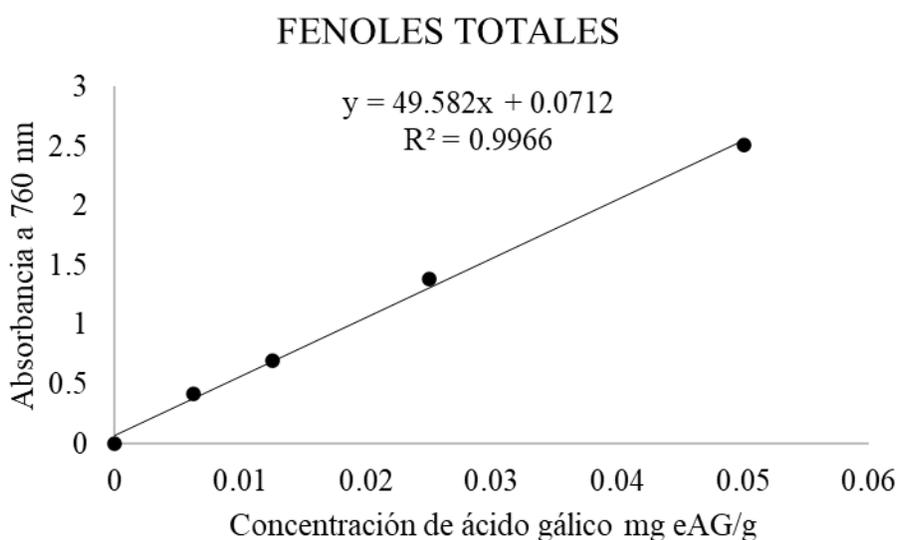


**Figura 19.** Mecanismo de acción del reactivo Folin-Ciocalteu. Recuperado de “Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu” por García *et al.*, 2015.

**Cuadro 6.** Curva de calibración de ácido gálico.

Tubo	Ácido gálico (mg/ml)	Patrón (ácido gálico $\mu$ l)	Agua destilada ( $\mu$ l)	Folin-Ciocalteu ( $\mu$ l)	$Na_2CO_3$ ( $\mu$ l)
Blanco	-	-	700	50	150
1	0.00625	3.12	798.88	50	150

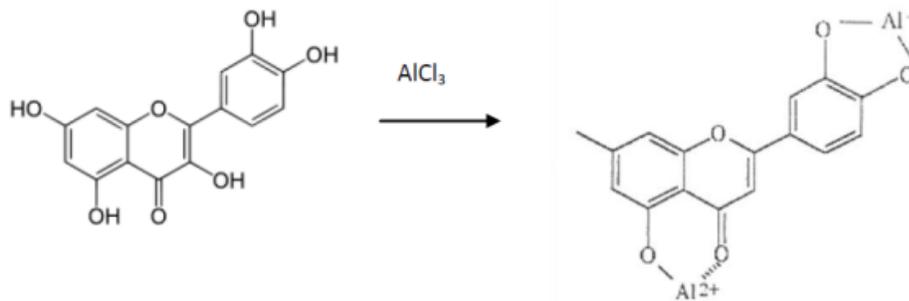
2	0.0125	6.25	793.75	50	150
3	0.0250	12.5	787.5	50	150
4	0.05	25.0	775.0	50	150
5	0.1	50.0	750.0	50	150
6	0.2	100.0	0	50	150



**Figura 20.** Curva de fenoles totales.

## Apéndice II

La determinación de la concentración de flavonoides totales mediante el Método de Dowd se basa en la reacción colorimétrica del  $AlCl_3$  que va hacia amarillo y puede medirse por espectrofotometría a 450 nm. Esta consiste en la formación de complejos estables ácidos con el grupo ceto en C-4 o bien en el grupo hidroxilo C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles, así como la formación de complejos lábiles ácidos con los grupos orto-dihidroxi del anillo A o B de los flavonoides en medio básico. Para construir la curva de calibración la quercetina es utilizada como material estándar (Kalita et al., 2013).

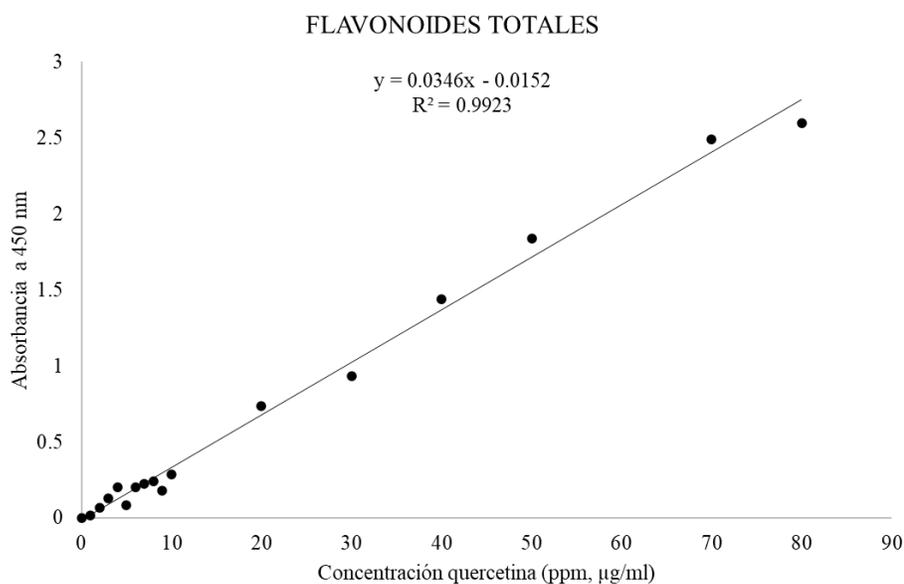


**Figura 21.** Estructura del complejo  $AlCl_3$  – flavonoide. Recuperado de “Manual de prácticas de bromatología funcional” por Martínez, 2020.

**Cuadro 7.** Curva de calibración de quercetina.

[ ] ppm	$\mu$ l stock de quercetina	$\mu$ l de MeOH	$AlCl_3$ al 2%
1	10	990	1
2	20	980	1
3	30	970	1
4	40	960	1
5	50	950	1
6	6	994	1
7	7	993	1
8	8	992	1
9	9	991	1
10	10	990	1
20	20	980	1
30	30	970	1
40	40	960	1

50	50	950	1
60	60	940	1
70	70	930	1
80	80	920	1
90	90	910	1
100	100	900	1



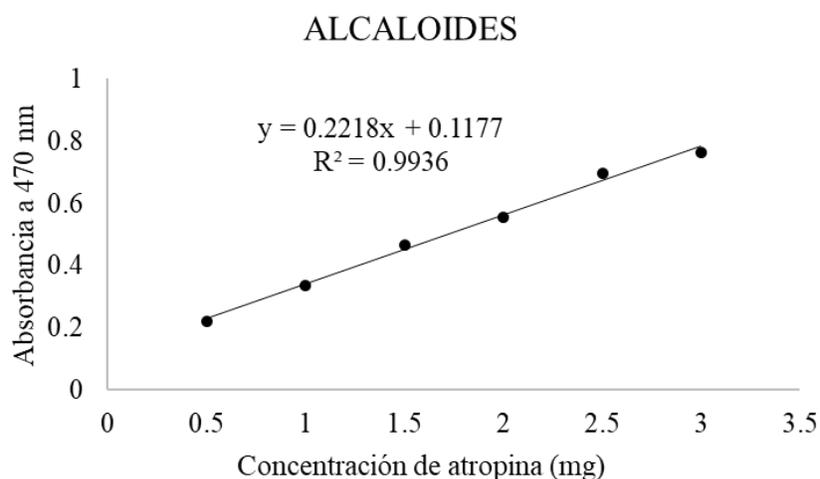
**Figura 22.** Curva de flavonoides totales.

### Apéndice III

La técnica se basa en la capacidad de los alcaloides para disolverse en medio ácido (fosfato de sodio pH 4.7) y para ser arrastrados por solventes de baja polaridad (cloroformo).

**Cuadro 8.** Curva de calibración de atropina.

Atropina (mg)	Buffer fosfato (ml)	Verde bromocresol (ml)
0.5	5	5
1.0	5	5
1.5	5	5
2	5	5
2.5	5	5
3	5	5

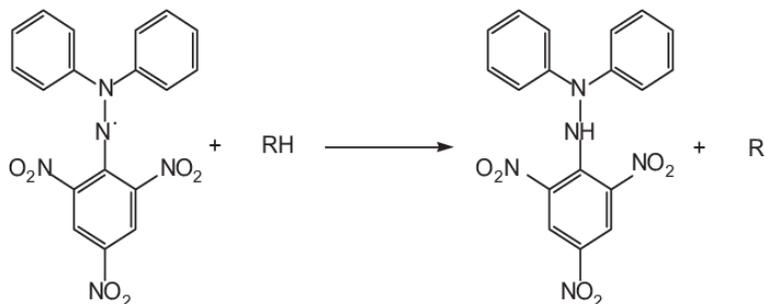


**Figura 23.** Curva de alcaloides totales.

#### Apéndice IV

El 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) es un radical libre con un electrón desapareado que le da una coloración violeta y que no dimeriza. Cuando el DPPH está en contacto con una sustancia que le puede donar un átomo de hidrógeno, éste se reduce, produciendo un cambio a color amarillo dada por el grupo picril (Molyneux, 2004). Es por ello la Capacidad antioxidante Media ( $CA_{50}$ ) se evalúa con el grado de decoloración de una solución metanólica de DPPH, por la adición del

compuesto activo (quercetina) a distintas concentraciones. Se mide espectrofotometría (540 nm) la concentración a la cual el radical es reducido al 50%.



**Figura 24.** Estructura del DPPH y su reducción por un antioxidante. Recuperado de “Free radical scavenging potential and total phenolic and flavonoid content of *Ziziphus mauritiana* and *Ziziphus nummularia* fruit extracts” por Dureja y Dhiman, 2012.

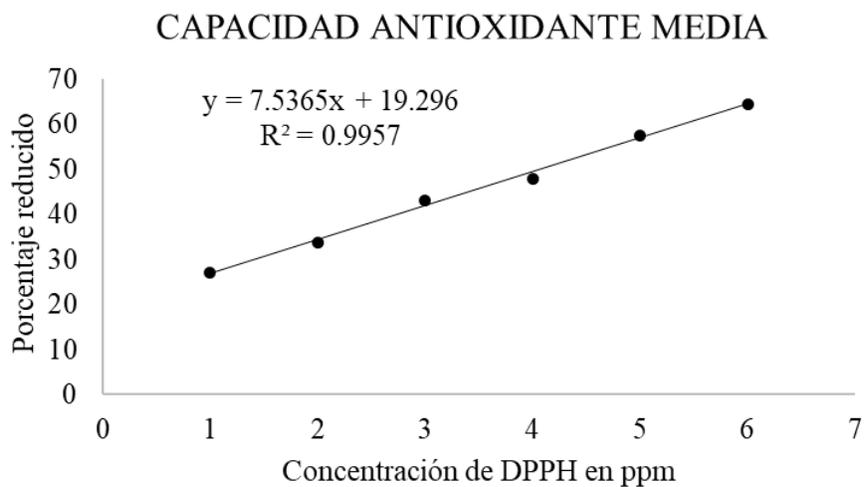
**Cuadro 9.** STOCK 2 (20  $\mu$ l del STOCK 1/180  $\mu$ l de metanol).

[ ] ppm	$\mu$ l stock	$\mu$ l de MeOH
1	10	990
2	20	980
3	30	970
4	40	960

**Cuadro 10.** STOCK 1 de (10 mg/10 ml).

[ ] ppm	$\mu$ l stock	$\mu$ l de MeOH			
			9	9	991
5	5	995	10	10	990
6	6	994	20	20	980
7	7	993	30	30	970
8	8	992	40	40	960

50	50	950	300	300	700
60	60	940	400	400	600
70	70	930	500	500	500
80	80	920	600	600	400
90	90	910	700	700	300
100	100	900	800	800	200
150	150	850	900	900	100
200	200	800	1000	1000	0
250	250	750			

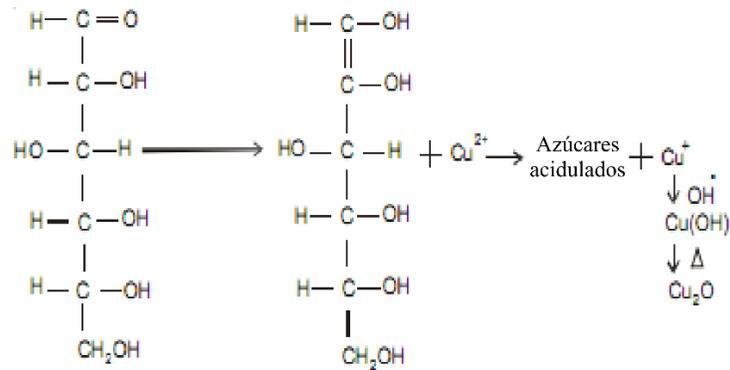


**Figura 25.** Curva de reducción DPPH utilizando las concentraciones 1-6 ppm de quercetina.

### Apéndice V

Los azúcares reductores como la glucosa reaccionan con el reactivo de cobre formando óxido cuproso de color rojo, debido a la donación de electrones del azúcar al ion oxidante. El óxido cuproso precipitado insoluble no puede valorarse fotométricamente, por lo que se trata con el reactivo de arsenomolibdato que lo transforma en un ion verdoso que se mide en el

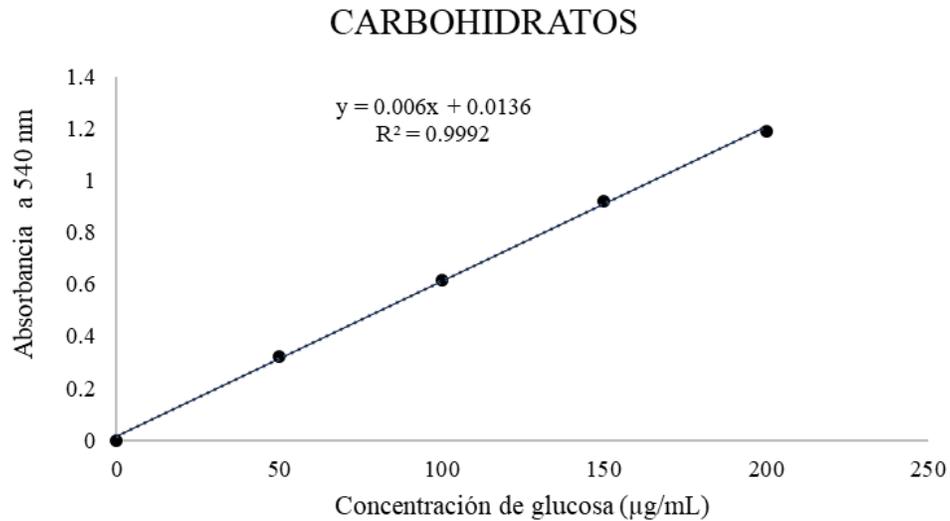
espectrofotómetro. El agente reductor actúa como factor limitante, por lo que la cantidad de  $\text{CuO}_2$  es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra (González y Peñalosa, 2000).



**Figura 26.** Reacción de la glucosa con el reactivo Nelson-Somogy. Recuperado de “Biomoléculas. Métodos de Análisis” por González y Peñalosa, 2000.

**Cuadro 11.** Curva de calibración de glucosa.

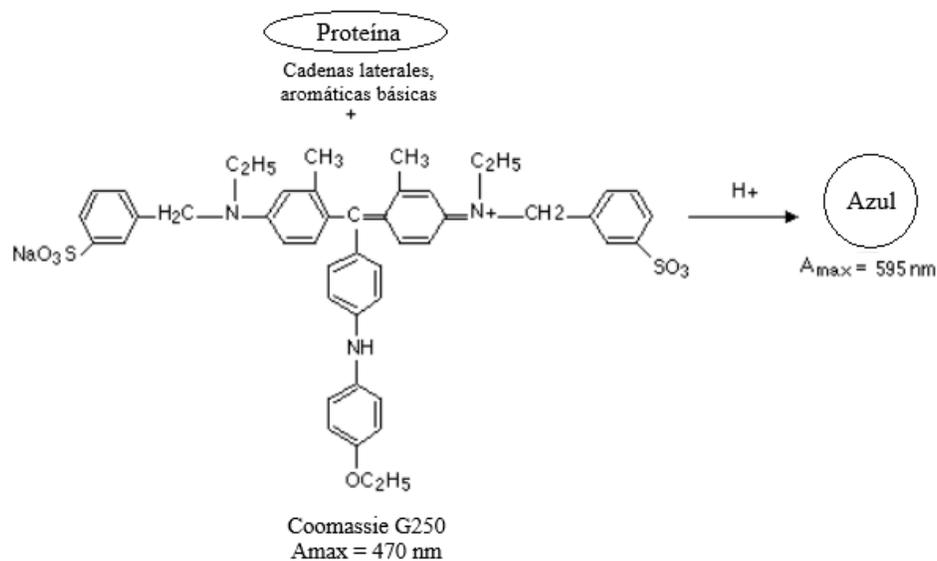
<b>Tubos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Patrón de glucosa (ml)</b>	-	0.25	0.50	0.75	1.0	-
<b>Agua destilada (ml)</b>	1.0	0.75	0.50	0.25	-	-
<b>Reactivo de cobre (ml)</b>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0



**Figura 27.** Curva de carbohidratos.

### Apéndice VI

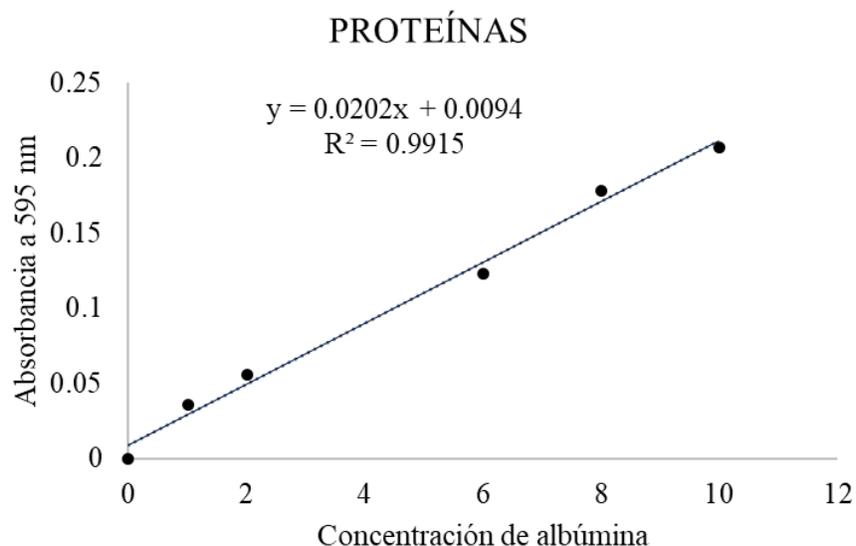
La estimación de la concentración de proteínas mediante el Método de Bradford se basa en la unión del colorante azul de Coomassie G250 a los residuos de Arg, Trp, Tyr, His y Phe de las proteínas. La forma catiónica del colorante, que predomina en la solución ácida del reactivo puede leerse en el espectrofotómetro a 470 nm. Por el contrario, en su forma aniónica unido a los residuos de la proteína se lee a 595 nm. Por lo tanto, la cantidad de colorante unido a la proteína se puede cuantificar midiendo la absorbancia de la solución a 595 nm (Méndez, 2022).



**Figura 28.** Reacción de las proteínas con el reactivo de Bradford (Coomassie G250). Recuperado de “Guía práctica de bioquímica” por Méndez y Viola, 2022.

**Cuadro 12.** Curva de calibración de albúmina.

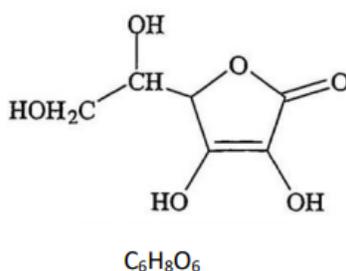
<b>Tubo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<b>Albúmina (µg)</b>	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0.1	-
<b>Stock de albúmina (µl)</b>	100	80	60	40	20	10	-
<b>PBS (µl)</b>	60	80	100	120	140	150	160
<b>Reactivo de Bradford (µl)</b>	40	40	40	40	40	40	40



**Figura 29.** Curva de proteínas.

### Apéndice VII

La estimación de la Vitamina C se basa en el uso, a un pH ácido, del reactivo Folin-Ciocalteu. Se sabe que este tiene una reactividad mínima en este rango, por lo que solo agentes reductores fuerte como el ácido ascórbico pueden reducirlo. El color resultante puede leerse en un espectrofotómetro a 760 nm (Jagota y Dani, 1982).

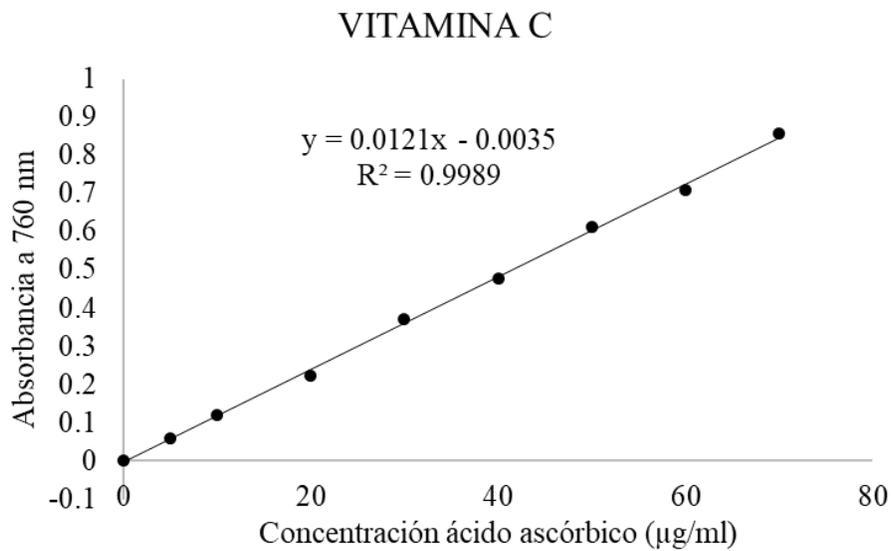


**Figura 30.** Estructura de la Vitamina C (ácido ascórbico). Recuperado de “Vitamina C” por RACIM.

Se preparó para la curva una solución de 5 g ácido ascórbico en 50 ml, de este stock se toman los volúmenes descritos en el Cuadro 13.

**Cuadro 13.** Curva de calibración de ácido ascórbico.

Tubo	Ácido ascórbico (µl/ml)	Ácido ascórbico stock (µl)	Agua (µl)	Folin-Ciocalteu (µl)
1	0	0	1000	100
2	5	50	950	100
3	10	100	900	100
4	20	200	800	100
5	30	300	700	100
6	40	400	600	100
7	50	500	500	100
8	60	600	400	100
9	70	700	300	100



**Figura 31.** Curva patrón de Vitamina C.

## 7. Referencias

Acosta-Gnass, S. (2005). Enterococcus. CODEINEP. Disponible: <https://codeinep.org/wp-content/uploads/2019/06/Enterococcus.pdf>

Aguilera, G., Gil, F., González, A., Nieves, B., Rojas, Y., Rodríguez M.A. y Vit, P. (2009). Evaluación de actividad antibacteriana de mieles de *Apis mellifera*, contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 40(1): 21-25. Disponible: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-04772009000100004&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772009000100004&lng=es&tlng=es)

Almeida-Muradian, L.B., Stramm, K.M., Horita, A., Barth, O.M., Freitas, A.S., y Estevinho, L.M. (2013). Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*. *International Journal of Food Science and Technology*, 48: 1698–1706. DOI:10.1111/ijfs.12140

Ávila, G. (2022). Compuestos marcadores y propiedades antioxidantes de mieles de Quintana Roo, México. [Tesis de doctorado]. Universidad Autónoma Chapingo. Disponible: <https://repositorio.chapingo.edu.mx/server/api/core/bitstreams/28fc3f8f-ce92-4be3-a411-1e255ae4f010/content>

Balcázar-Cruz L., Valadez-Villarreal A., López-Naranjo J. I., Ochoa-Flores A. A., Rodríguez-Blanco L. y López-Hernández E. (2019). Relación del contenido de flavonoides y color en miel de abeja (*Apis mellifera*) originaria del estado de Tabasco, México. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4: 818-825. Disponible: <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume4/4/9/115.pdf>

Benítez-Estrada, Villanueva-Sánchez, González-Rosendo, Alcántar-Rodríguez, Puga-Díaz y Quintero-Gutiérrez. (2020). Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y

plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorimétricos (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP). *TIP Revista Especializada de Ciencias Químico-Biológicas*, 23: 1-9. Disponible: <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.244>

Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J. S., Morse, S. A. y Mietzner, T. A. (2011). *Microbiología médica. Jawetz, Melnick y Adelberg*. México, Editorial McGraw-Hill.

Cabrera, L., Ojeda, G., Céspedes, E. y Colina, A. (2003). Actividad antibacteriana de miel de abejas multiflorales (*Apis mellifera Scutellata*) de cuatro zonas apícolas del Estado de Zulia, Venezuela. *Revista científica FCV-LUZ*, 13(3): 205-211. Disponible: [https://www.researchgate.net/profile/Graciela-Ojeda-De-Rodriguez/publication/262710053\\_Actividad\\_antibacteriana\\_no\\_peroxido\\_de\\_mieles\\_zulianas/links/5ac53ed1aca2720544cf7b11/Actividad-antibacteriana-no-peroxido-de-mieles-zulianas.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Graciela-Ojeda-De-Rodriguez/publication/262710053_Actividad_antibacteriana_no_peroxido_de_mieles_zulianas/links/5ac53ed1aca2720544cf7b11/Actividad-antibacteriana-no-peroxido-de-mieles-zulianas.pdf)

Castellanos-Potenciano, B., Gallardo-López, F., Sol-Sánchez, Á., Landeros-Sánchez, C., Díaz-Padilla, G., Sierra-Figueroa, P., Santibáñez-Galarza, J. y Zúñiga-González C. (2016). Impacto potencial del cambio climático en la apicultura. *Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático*, 2(1): 1-10. ISSN: 2410-7980. Disponible: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/394/3941750035/>

Chávez- Borges D., Quintero-Lira A., López-Oliveira A. C. F., Martínez-Juárez V.M., Del Razo-Rodríguez O.E., Jiménez- Alvarado R. y Campos Montiel R. G. (2019). Determinación de compuestos bioactivos y contenido de selenio en diversas mieles del estado de Hidalgo. *Journal of Energy, Engineering Optimization and Sustainability*, 3(2): 1-18. Disponible: <https://revistas.ujat.mx/index.php/JEEOS/article/view/3405>

Chua, L.S. y Chan, G.F. (2013). Honey protein extraction and determination by mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 405:3063-3074. Disponible: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-012-6630-2>

Ciappini, C. M., Gatti, B. M. y Di Vito, V. M. (2013). El color como indicador del contenido de flavonoides en miel. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 15(19): 59-63. Disponible: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-75872013000100009](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-75872013000100009)

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2019). M100: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing-Thirtieth Edition. Pennsylvania, USA, 184 p.

Duraffourd, C. (1987). *Cuadernos de fitoterapia*. Barcelona, Masson.

Dureja, A.G. y Dhiman, K. (2012). Free radical scavenging potential and total phenolic and flavonoid content of *Ziziphus mauritiana* and *Ziziphus nummularia* fruit extracts. *International Journal of Green Pharmacy*. 6(3): 187-192. DOI: 10.4103/0973-8258.104929

Esteva, L., Ibarguen Mondragon, E. y Romero Leyton, J. (2011). Un modelo matemático sobre bacterias sensibles y resistentes a antibióticos. *Matemáticas: Enseñanza Universitaria*, 19(2): 55-73. ISSN: 0120-6788. Disponible: <https://www.redalyc.org/articulo.a0?id=46822255005>

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (1981). Codex Alimentarius: Norma para la miel. (CXS 12-1981. Rev. 2001; en. 2019). Disponible: [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS\\_012s.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS_012s.pdf)

Gallez, L. (2006). Los colores, aromas y texturas de nuestras mieles. *AgroUNS*, 6: 10-15. Disponible: <https://core.ac.uk/download/pdf/153565975.pdf>

Gracia-Apac, C., Pardo-Valdespino, J. y Seas-Ramos, C. (2003). Bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* y absceso de partes blandas en un paciente post-operado: Reporte de un caso. *Rev Med Hered*, 14(4): 221-223. Disponible: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v14n4/v14n4cc01.pdf>

García, E., Fernández, I. y Fuentes, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. ETSIAMN. Universitat Politècnica de València. Disponible: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20al.pdf?sequence=1>

Gobierno del Estado de Oaxaca. (2020). Diagnóstico. Plan de Desarrollo Regional, Papaloapan. Disponible: <https://www.oaxaca.gob.mx/coplade/wp-content/uploads/sites/29/2021/04/Papaloapan.pdf>

González, M. y Peñalosa, C. (2000). Biomoléculas. Métodos de análisis. Universidad Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

González, S., Tamayo, J., Tamayo, N., Toledo, V. y Vargas, M. (2013). Productos con alto contenido de miel, como opción para incrementar su uso en Yucatán. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 33: 576-586. ISSN: 1405-9282. Disponible: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=14127709017>

Guzmán, E. y Correa, A. (2012). Patología, diagnóstico y control de las principales enfermedades y plagas de las abejas melíferas. Yire. Disponible: [https://atlas-abejas.agricultura.gob.mx/pdfs/PATOLOGIA\\_DIAGN\\_CNTRL\\_ENFRMDDS\\_ABEJAS\\_MELIFERAS.pdf](https://atlas-abejas.agricultura.gob.mx/pdfs/PATOLOGIA_DIAGN_CNTRL_ENFRMDDS_ABEJAS_MELIFERAS.pdf)

INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). (2021). Comunicado de prensa Núm. 652/21 sobre el Atlas Nacional de las abejas y derivados apícolas. Disponible:

[https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/especiales/AtlasN\\_abejas2021.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/especiales/AtlasN_abejas2021.pdf)

Jagota, S.K y Dani, M. (1982). A New Colorimetric Technique for the Estimation of Vitamin C Using Folin Phenol Reagent. *Anal. Biochem.* 127: 178-182. Disponible: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90162-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90162-2)

Kalita, P., Barman, T. y Kalita, R. (2013). Estimation of total flavonoids content (TFC) and antioxidant activities of methanolic whole plant extract of *Biophytum sensitivum* Lin. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 3(4): 33-37. Disponible: <https://jddtonline.info/index.php/jddt/article/view/546/316>

Lino, F. (2002). Estudio de la calidad de la miel de abeja *Apis mellifera* L. comercializada en Tegucigalpa, Honduras. [Tesis de licenciatura]. Universidad Zamorano. Disponible: <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/c4426506-bd60-46a5-87ff-4d6dcfab51c/content>

Lizarbe, M. (2009). Bacterias y virus ¿Cómo defendernos? *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 103(1): 115-172. Disponible: <https://rac.es/ficheros/doc/00919.pdf>

López, A. (2014). Efecto de la humedad de la miel y temperatura de descristalizado en la calidad de la miel procesada. [Tesis de licenciatura]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Disponible: <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/4222c063-a213-4e37-ae85-841403184e22/content>

Machado De-Melo, A., Almeida-Muradian, L., Sancho, M. y Pascual-Maté, A. (2018). Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*, 57(1): 5-37. DOI: [10.1080/00218839.2017.1338444](https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1338444)

Majtan, J., Sojka, M., Palenikova, H., Bucekova, M. y Majtan, Viktor. (2020). Vitamin C Enhances the Antibacterial Activity of Honey against Planktonic and Biofilm-Embedded Bacteria. *Molecules*, 25(4): 992. Disponible: <https://doi.org/10.3390/molecules25040992>

Martínez, N. (2020). Manual de prácticas de bromatología funcional. Universidad Veracruzana. Disponible: <https://www.uv.mx/qfb/files/2020/10/Manual-Bromatologia-Funcional.pdf>

Martínez-Flores, González-Gallego, Culebras y Tuñón. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6): 271-278. Disponible: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>

Martin-Culma, N. y Arenas-Suárez, N. (2018). Daño colateral en abejas por la exposición a pesticidas de uso agrícola. *Entramado*, 14(1): 232-240. ISSN: 1900-3803. Disponible: <http://dx.doi.org/10.18041/entramado.2018v14n1.27113>

Méndez, D. (2022). Cuantificación de proteínas: Método de Bradford. En Badrán, F (Ed.), Guía práctica de bioquímica (pp. 63-70). Editorial Universitaria.

Mendoza-Bacilio, Cl., Epifanio-Gómez, R., Yam-Puc, A., Ávila-Caballero, LP., Palemón-Alberto, F., Torres-Guzmán, F. y Bello-Martínez, J. (2022). Color influence on phenolic compounds and bioactive properties of honey from Guerrero, México. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 24(2): 5-11. Disponible: <https://www.scielo.org.mx/pdf/biotecnia/v24n2/1665-1456-biotecnia-24-02-5.pdf>

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

Morales, N. (2018). Diferenciando Bacterias Gram Positivo (+) y Gram Negativo (-) Mediante Tinción de Gram. Unidad de Apoyo para el Aprendizaje. CUAED/FES Iztacala-UNAM. Disponible:  
[http://132.248.48.64/repositorio/moodle/pluginfile.php/1729/mod\\_resource/content/10/contenido/index.html](http://132.248.48.64/repositorio/moodle/pluginfile.php/1729/mod_resource/content/10/contenido/index.html)

Okusa, P., Penge, O., Devleeschouwer, M. y Duez, P. (2007). Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacol.* 112: 476-481.

Otero-Salinas, A., Meneses-Pérez, J. y Águila-Sánchez, K. (2018). Propiedades curativas de la miel: un edulcorante natural proveniente de los principales polinizadores de las plantas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Disponible:  
[https://icupap.buap.mx/sites/default/files/revista/2018/03/3E7-PROPIEDADES\\_CURATIVAS-DE-LA-MIEL-DONE.pdf](https://icupap.buap.mx/sites/default/files/revista/2018/03/3E7-PROPIEDADES_CURATIVAS-DE-LA-MIEL-DONE.pdf)

Paredes, F. y Roca, J. (2004). Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Offarm*, 23(3): 116-124. Disponible: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13059414>

Pasachova, J., Ranírez, S. y Muñoz, L. (2019). *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *NOVA*, 17(32): 25-38. Disponible: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-25.pdf>

Pozo, G. (2016). Análisis de polifenoles totales y capacidad antimicrobiana de mieles de abeja de aguacate, alfalfa y eucalipto como tratamiento alternativo de infecciones de interés veterinario causadas por *Staphylococcus epidermidis* y *aureus*. [Tesis de licenciatura]. Universidad de las

Américas. Disponible: <https://dspace.udla.edu.ec/jspui/bitstream/33000/5390/5/UDLA-EC-TMVZ-2016-20.pdf>

RACIM (Red Argentina de Centros de Información de Medicamentos). (2020). Vitamina C. [Consultado: 10 de septiembre de 2023]. Disponible: <http://cime.fcq.unc.edu.ar/wp-content/uploads/sites/15/2020/09/RACIM-Vit-C-versi%C3%B3n-1-01.07.2020-1.pdf>

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

Ramos, A. y Pacheco, N. (2016). Producción y comercialización de miel y sus derivados en México: Desafíos y oportunidades para la exportación. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. 196 pp. Disponible: [https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion\\_5f243ecb97f89.pdf](https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5f243ecb97f89.pdf)

Rodríguez-Ángeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública de México*, 44(5): 464-475. Disponible: [https://www.adiveter.com/ftp\\_public/E.coli.pdf](https://www.adiveter.com/ftp_public/E.coli.pdf)

Rodríguez, B. (2012). Caracterización química y evaluación de las actividades antioxidante y antimicrobiana de mieles florales: Naranja, Cactáceas y Campanilla. [Tesis de doctorado]. Universidad Autónoma de Querétaro. Disponible: <https://ri-ng.uaq.mx/xmlui/bitstream/handle/123456789/288/RI000077.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Rodríguez, P. y Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 16(2): 166-167. Disponible: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación). (2018). Buenas prácticas pecuarias en la producción primaria de la miel. Disponible: <https://atlasnacionaldelasabejasmx.github.io/atlas/pdfs/Manual BPP en la Producción primaria de Miel octubre 2018.pdf>

Sánchez, M., González, T., Ayora, T., Evangelista, Z., Pacheco, N. (2017) ¿Qué son los microbios? *Ciencia*, 68(2): 10-17. Disponible: [http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68\\_2/PDF/QueSonMicrobios.pdf](http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68_2/PDF/QueSonMicrobios.pdf)

Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. (2020). Norma Oficial Mexicana NOM-004-SAG/GAN-2018, Producción de miel y especificaciones. Diario Oficial de la Federación. Disponible: [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5592435&fecha=29/04/2020#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5592435&fecha=29/04/2020#gsc.tab=0)

Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R. y Verdian-rizi, M. (2008). Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai Journal Pharmacology Science*. 32, 17-20.

SIEGVER (Sistema de Información Estadística y Geográfica del Estado de Veracruz de Ignacio de la Llave). (2021). Cuadernillos Municipales. Soledad de Doblado. Disponible: [http://ceieg.veracruz.gob.mx/wp-content/uploads/sites/21/2021/06/SOLEDAD-DE-DOBLADO\\_2021.pdf](http://ceieg.veracruz.gob.mx/wp-content/uploads/sites/21/2021/06/SOLEDAD-DE-DOBLADO_2021.pdf)

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

Soriano, A. (2020). Ácidos fenólicos como agentes antibacterianos en el desarrollo de materiales activos para el envasado de alimentos. [Tesis de maestría]. Universidad politécnica de valencia.

Valle, Y., Méndez, G. y Suárez, B. (2019). Efecto antibacteriano in vitro de la miel producida por la abeja *Apis mellifera* en microorganismos Gram + y Gram -, en los laboratorios del departamento de Bioanálisis clínico I.P.S. Marzo-Diciembre del año 2018, UNAN-Managua. [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua. Disponible: <https://repositorio.unan.edu.ni/10758/1/99977.pdf>

Zamora, L. y Arias, M. (2011). Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abeja sin aguijón. *Revista Biomédica*, 22(2): 59-66. Disponible: <https://www.revistabiomedica.mx/index.php/revbiomed/article/view/101>

Zorzetto, C. (2015). Evaluación de la capacidad antimicrobiana y antioxidante de potenciales productos bioactivos de origen vegetal. [Tesis de doctorado]. Universidad de La Laguna. Disponible: <https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/26015/Evaluaci%C3%B3n%20de%20la%20capacidad%20antimicrobiana%20y%20antioxidante%20de%20potenciales%20productos%20bioactivos%20de%20origen%20vegetal.pdf?sequence=1&isAllowed=y>