



**Universidad Nacional Autónoma de México**

---

---

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**“Análisis de una miel de panal silvestre y una de  
floración de durazno-ciruela.”**

TESIS  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
Biólogo  
Presenta:

**Torres Chávez Mikel**

Directora:

**Dra. María Margarita Canales Martínez**

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México.

2024





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.

## **Agradecimientos.**

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

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

Al Dr. Marco Aurelio y a los integrantes del laboratorio de Investigación Biomédica de Productos Naturales que me apoyaron con todas mis dudas y me orientaron las veces que fueron necesarias.

A los compañeros del laboratorio de Farmacognosia, en especial a Ana, Uriel, Jimena por integrarme al equipo, esclarecer todas mis dudas y siempre apoyarme en todo lo necesario.

A mis compañeros tesistas, por apoyarme en todo, en especial a Sofia y Jessica que me acompañaron y ayudaron durante este trabajo.

A mis compañeros de carrera, Luis, Santiago, Baruc, Karla y Fernanda que a pesar de ya casi no hablar son importantes para mí y esta etapa de mi vida. También agradecer especialmente a Abby y Sofia por ser mis amigas durante toda la carrera y siempre apoyarme en todo y principalmente por su amistad.

## **Dedicatorias.**

A mi padre, Miguel Ángel Torres, por nunca dudar de mí y siempre apoyarme en todos los aspectos. Después de tanto he alcanzado una meta más gracias a ti, por tu apoyo, paciencia, enseñanzas y cariño que me has demostrado todo el tiempo.

A mi madre, Graciela Chávez, por siempre estar ahí incluso en momentos difíciles, por nunca dudar de mí y siempre darme el impulso para seguir adelante y un nunca desistir de mis objetivos. Con tu apoyo y paciencia he logrado una meta más y gracias por todos tus sacrificios que has hecho por mí, créeme que han valido la pena.

A mi hermana, Zyanya Torres, que me apoyó en todo este proceso y siempre creyó en mí para poder concluir un objetivo más y superarme.

A pesar de que no lo digo seguido, o más bien casi nunca lo digo, los amo a todos.

A mis mejores amigos, Omar e Itzel, por ser una parte muy importante en mi vida y siempre apoyarme y nunca juzgarme. Les deseo lo mejor para la vida y un futuro prometedor y exitoso.

# Índice

Índice de figuras.....	ii
Índice de cuadros.....	iii
Resumen.....	iv
Introducción.....	1
Antecedentes. ....	3
Hipótesis. ....	5
Objetivo general .....	5
Materiales y métodos. ....	6
Resultados y análisis. ....	12
Discusión.. ....	23
Conclusiones. ....	28
Apéndice I .....	29
Apéndice II .....	30
Apéndice III .....	31
Apéndice IV.....	32
Apéndice V.....	33
Apéndice VI .....	35
Apéndice VII .....	36
Apéndice VIII .....	38
Apéndice IX.....	39
Bibliografía .....	40

## Índice de figuras:

Figura 1. Zona de colecta miel de panal silvestre.....	6
Figura 2. Zona de colecta miel de floración durazno ciruela.....	7
Figura 3. Perforación de pozos .....	11
Figura 4. Llenado de pozos .....	11
Figura 5. Prueba de dextrina. ....	13
Figura 6. Titulación ácidos orgánicos .....	14
Figura 7. Curva patrón glucosa .....	14
Figura 8. Curva patrón albumina .....	15
Figura 9. Pruebas cualitativas .....	16
Figura 10. Curva patrón ácido gálico .....	16
Figura 11. Curva patrón quercetina .....	17
Figura 12. Curva patrón atropina .....	18
Figura 13. Curva capacidad antioxidante miel panal silvestre .....	19
Figura 14. Curva capacidad antioxidante miel floración durazno ciruela .....	19
Figura 15. Curva patrón ácido ascórbico .....	20
Figura 16. Análisis estadístico .....	22
Figura 17. Halos de inhibición .....	22

Índice de cuadros.

Cuadro 1. Características organolépticas .....	12
Cuadro 2. Características fisicoquímicas.....	12
Cuadro 3. Propiedades bioquímicas.....	20
Cuadro 4. Medición halos de inhibición .....	21
Cuadro 5. Carbohidratos reductores .....	30
Cuadro 6. Proteínas .....	31
Cuadro 7. Fenoles .....	32
Cuadro 8. Flavonoides .....	33
Cuadro 9. Alcaloides.....	35
Cuadro 10. Capacidad antioxidante .....	36
Cuadro 11. Ácido ascórbico.....	38

## Resumen:

La medicina actual ha avanzado de forma rápida por lo que se han desarrollado tratamientos efectivos contra diferentes enfermedades causadas por microorganismos, sin embargo, el uso indiscriminado de antibióticos, así como la interrupción de los tratamientos ha causado un problema bastante conocido que es la resistencia bacteriana, siendo ésta una de las principales causas de muerte por infecciones bacterianas. Afortunadamente la medicina tradicional sigue estando vigente hasta nuestros días fungiendo un papel alternativo a los antibióticos actuales, siendo la miel uno de los productos naturales que más se utiliza debido a su versatilidad y cualidades.

En este trabajo se realizó el estudio bromatológico, fisicoquímico y antibacteriano de dos mieles producidas por la especie *Apis mellifera*, siendo una de un panal silvestre proveniente del estado de Guanajuato y otra miel de floración de durazno-ciruela proveniente del estado de Veracruz.

En cuanto a los resultados obtenidos, en cuestión de la bromatología la miel de floración de durazno-ciruela tuvo los valores más altos en la concentración de carbohidratos reductores, fenoles y ácido ascórbico, influyendo así en la capacidad antioxidante media (CA<sub>50</sub>) teniendo un porcentaje de reducción del 40% a 20 ppm mientras que para la miel de panal silvestre se obtuvieron valores mayores en flavonoides y ácidos orgánicos, teniendo una capacidad antioxidante del 38% a 400 ppm.

En cuanto a la actividad antibacteriana la miel de floración de durazno-ciruela fue la que presentó mayor actividad inhibiendo el crecimiento de 4 cepas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* y *E. coli*) por el otro lado la miel de panal silvestre sólo inhibió el crecimiento de 2 cepas bacterianas (*S. epidermidis* y *E. coli*) ninguna de las dos mieles inhibió la cepa de *E. faecalis*.

Con estos resultados, tomando en cuenta el lugar de origen, se puede concluir que las propiedades únicas de cada miel como color, sabor, consistencia, concentración de metabolitos secundarios, capacidad antioxidante y efecto antibacteriano de las mieles es multifactorial influyendo factores como la madurez de la miel, la humedad, el contenido de peróxido de hidrógeno, origen floral, concentración de metabolitos secundarios, manejo y almacenamiento entre muchos otros que le conceden las particularidades a la miel.



# Introducción.

El uso inadecuado de antibióticos es la principal causa de un problema a nivel mundial conocido como multirresistencia bacteriana que es bastante alarmante y podría empeorar al ser una situación de un punto irreversible y causar muertes por infecciones provocadas por microorganismos patógenos; debido a esto es que en los últimos años se ha implementado el uso de antibióticos más fuertes debido a la resistencia de los microorganismos a éstos.

Virus, hongos y bacterias son grupos de organismos que han desarrollado estrategias de defensa para evitar una acción nociva sobre ellos (1). Estas estrategias de defensa son bastante efectivas ya que en la actualidad a pesar del desarrollo rápido de antibióticos nuevos y más fuertes no se asemeja a la rápida aparición de nuevos organismos multirresistentes por lo que se asume que en un futuro no muy lejano no habría agentes para combatir fuertes infecciones causadas por microorganismos patógenos (2).

Las bacterias son uno de los microorganismos que han desarrollado multirresistencia a gran velocidad debido a diferentes mecanismos que les permiten inactivar la acción de los antibióticos, esta resistencia puede darse de manera natural, por mutaciones o por transferencia de genes. Algunos de los mecanismos que han desarrollado implican acciones como la expulsión o excreción de productos tóxicos, modificaciones en sus membranas haciéndolas menos permeables, producción de enzimas inactivantes y modificación de proteínas (3,4,5).

Afortunadamente la medicina tradicional sigue vigente hasta nuestros días sirviendo como una alternativa eficaz y con buenos resultados. La rama de la ciencia que se encarga de explicar los mecanismos de acción de la medicina tradicional se conoce como Farmacognosia, siendo de gran utilidad al estudiar los principios activos naturales de productos de origen vegetal como extractos de hojas, cortezas, flores así como de origen animal, como es el caso del propóleo y miel productos derivados de las abejas (6), por mencionar algunos, siendo la miel uno de los productos más utilizados debido a diferentes propiedades que se le atribuyen (7)

La miel, sustancia natural producida por las abejas *Apis mellifera* L. proveniente del néctar de las flores (8) o proveniente de diferentes sustancias extra florales (9) es un alimento que ha sido aprovechado por el humano, por diferentes culturas y en diferentes ámbitos dentro de los que destaca su uso medicinal para el tratamiento de problemas gastrointestinales, tratar heridas y quemaduras, como un agente antimicrobiano (10) por mencionar algunos.

La composición de la miel es compleja y la calidad organoléptica son meramente dependientes del tipo de origen floral; la miel está compuesta mayormente de carbohidratos, como fructosa y glucosa, vitaminas, minerales y trazas de aminoácidos (11). Las características organolépticas de las mieles en general dependen del contenido de azúcares totales, de su madurez y de la presencia de isoprenoides, carotenos, alcaloides, flavonoides, ácidos orgánicos, glicósidos, aminoácidos, cumarinas, que otorgan propiedades a las mieles de abeja y que definen el sabor de este producto (12).

Dentro del microbiota natural de la miel se conoce la presencia de bacterias y levaduras, pero en una proporción muy pequeña y están asociadas a la flora bacteriana de las abejas (13) además se debe considerar la forma de recolecta de la miel, así como su almacenamiento ya que de no contar con las medidas de calidad necesarias puede contaminar la miel (14).

El estudio de las propiedades fisicoquímicas de la miel, que principalmente dependen del tipo de suelo, clima, condiciones ambientales y contribución de la planta (15), es de gran utilidad para la determinación de la calidad y pureza de ésta (12), para esto se utilizan valores previamente ya estandarizados en la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-004-SAG/GAN-2018 (16). Dentro de los aspectos a evaluar para determinar la calidad de la miel se encuentra la presencia de humedad, ya que al tener una alta cantidad de agua fermenta y, debido a que la miel contiene una cantidad baja de ácidos orgánicos, al fermentar, aumenta el contenido de estos ácidos, facilitando el crecimiento de las levaduras y en esas condiciones ya no puede comercializarse, por lo que el monitoreo de los parámetros de calidad de la miel es importante para su consumo otros aspectos a considerar son un pH ácido, concentraciones específicas de glucosa y fructuosa entre otros. Aunado a los parámetros de calidad previamente mencionados se desprende un problema de adulteración del producto, ya que en los últimos años se ha empezado a utilizar “glucosa” que se vende en el comercio, esta sustancia azucarada se obtiene generalmente por la hidrólisis del almidón de maíz, y contiene además de glucosa, dextrinas que no permite que la miel cristalice y sea de alguna manera más sencilla de comercializar (17); esto debido a la alta demanda de miel. Como consecuencia, la miel puede disminuir su calidad y perder sus propiedades nutrimentales y medicinales. Es importante mencionar el problema de adulteración ya que al consumir la “miel” adulterada no se obtiene ningún valor nutricional o algún beneficio a la salud ya que la miel es conocida por su alto aporte de nutrientes y de contener azúcares ajenos pierde esa cualidad ya que la miel de abeja es un alimento energético de calidad y puede sustituir perfectamente al azúcar de caña que se reconoce como agente indirecto de caries dentales, problemas cardiovasculares, diabetes, hipertensión, sobrepeso

(18). La miel aporta 307 kilocalorías por cada 100 g, el contenido de vitaminas y minerales en miel es excelente fuente comparada con el azúcar refinado que no tiene ningún aporte (19).

En este estudio se evaluarán algunas propiedades químicas y antibacterianas de una muestra de miel de un panal silvestre y una muestra de miel de floración de durazno-ciruela con el fin de saber su pureza (sin contenido de edulcorantes), calidad y propiedades antibacterianas.

## Antecedentes:

- Cabrera y colaboradores (20) evaluaron la actividad antibacteriana de miel de abejas procedente de cuatro zonas apícolas del estado Zulia, Venezuela. Analizaron las muestras por triplicado utilizando cepas patógenas indicadoras de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* y *Proteus mirabilis* en concentraciones de  $1 \times 10^6$  UFC/mL y utilizando la técnica de difusión en agar. Los resultados obtenidos revelaron que la miel de abejas procedente de las cuatro zonas del estado Zulia, mostraron actividad antibacteriana del tipo bacteriostático contra las cepas bacterianas analizadas.
- Al-Mamary y colaboradores (21) evaluaron la actividad antioxidante y el contenido fenólico total de cinco tipos diferentes de miel yemen (*Acacia ehrenbergina* (Salam-Tehamah), *Acacia edgeworhi* (Somar-Hadramout), *Ziziphus spina-christi* L. (Sidr-Hadramout), *Ziziphus spina-christi* L. (Sidr-Taiz), Flor tropical (MarbaiHadramout), y cuatro tipos de orígenes importados (una flor tropical americana (Nueva Orleans), una origen americano-naranja (Florida), flor suiza, y una flor iraní-tropical). Cuatro de las cinco muestras de miel yemení presentaron un contenido fenólico total significativamente mayor que el de las mieles importadas. La actividad antioxidante total de las muestras diluidas varió entre el 6.48% (actividad prooxidante) y el 65.44% de inhibición.
- Estrada y colaboradores (22) evaluaron la actividad antimicrobiana de 25 muestras de miel de abeja, comercializadas en Costa Rica, contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *L. monocytogenes* y *A. niger*, así como su carga microbiológica. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel, realizaron el método de difusión en agar Müller-Hinton, realizando diluciones de la miel (100, 75, 50, 25, 12.5 y 6.25% v/v) y como resultado obtuvieron que solamente dos de las mieles

evaluadas (8%) no produjeron ningún tipo de inhibición en el crecimiento de las bacterias utilizadas en el estudio; el resto de las muestras inhibió el crecimiento de al menos una de las bacterias al emplear una concentración de 100% v/v de miel. *Staphylococcus aureus* fue el microorganismo cuyo crecimiento se vio mayormente afectado por la miel, obteniéndose halos de inhibición aún con concentraciones de 50% v/v y de 25% v/v.

- Majtan y colaboradores (23) investigaron el impacto de la vitamina C (Vit C) en la actividad antibacteriana de las mieles naturales contra patógenos bacterianos planctónicos e incorporados en biopelículas. Resultando que la vitamina C aumentó significativamente la actividad antibacteriana de las mieles probadas contra *Pseudomonas aeruginosa* en cultivos planctónicos, fue ineficaz contra *Staphylococcus aureus*. Por otro lado, cuando se implementó 100% miel de melaza con vitamina C (100 mg/g de miel) se observó la erradicación completa de casi todos los aislados bacterianos, incluido *S. aureus*. Además, una mezcla de miel y vitamina C fue parcialmente eficaz contra *Enterococcus faecalis*, mientras que la miel sola no mostró actividad antibacteriana contra esta bacteria.
- Romero (24) analizó metabolitos secundarios en las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de mieles florales mexicanas, 14 mieles del centro y sur de México y en concreto utilizó miel de Campanilla, Cactáceas y Naranja. Analizó el contenido de prolina, peróxido de hidrógeno y el perfil de compuestos fenólicos y azúcares mediante HPLC. Se investigó el perfil de metabolitos secundarios y la actividad antioxidante antes y después de un proceso de digestión *in vitro*. La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó con seis microorganismos patógenos. Identificó 13 compuestos fenólicos, destacando: catequina, rutina, ácido siríngico y ferúlico. Los azúcares mayoritarios fueron la fructosa y glucosa. El contenido de peróxido de hidrógeno fue de 88.33-111.83 ppm hasta 609.68-965.97 ppm. El contenido de prolina fue de 333.88-575.93 mg/kg. La miel de Naranja presentó los mejores resultados para contenido de fenoles totales y actividad antioxidante *in vitro*. La miel de Campanilla demostró el mejor índice de bioaccesibilidad y actividad antioxidante después del proceso de digestión *in vitro*. Todas las muestras evaluadas inhibieron el desarrollo de *Bacillus cereus*. Concluyendo que las mieles mexicanas evaluadas poseen actividad antioxidante y antimicrobiana.
- **Con base a lo antes mencionado, el problema y la hipótesis de esta investigación son los siguientes:**

**Problema:** ¿Las mieles, silvestre y de floración de durazno-ciruela, presentarán propiedades particulares que las caractericen como una mejor opción alimenticia y medicinal?

**Hipótesis:** Se tiene documentado que diversos tipos de miel presentan propiedades alimenticias y medicinales, entonces las mieles, silvestre y ciruela durazno, muy probablemente presenten características que demuestren su calidad como alimento y como una alternativa medicinal.

## Objetivos:

+ **Objetivo general:** Evaluar las propiedades fisicoquímicas y antibacterianas de dos mieles, una de panal silvestre y otra de ciruela-durazno.

+ **Objetivos particulares:**

De la muestra de miel.

1. Determinar sus propiedades organolépticas.

2. Determinar sus propiedades fisicoquímicas

+ Color.

+ Densidad.

+ Porcentaje de humedad.

+ Grados Brix.

+ Concentración de fructosa.

+ Ángulo de rotación.

+ pH.

+ Concentración de ácidos orgánicos.

+ Concentración de carbohidratos reductores.

+ Concentración de proteínas.

+ Concentración de fenoles, flavonoides, alcaloides.

+ Capacidad antioxidante.

+ Concentración de ácido ascórbico (vitamina C)

3. Evaluar su actividad antibacteriana.

## Materiales y métodos:

### + Obtención de la muestra de miel:

#### Miel de panal silvestre:

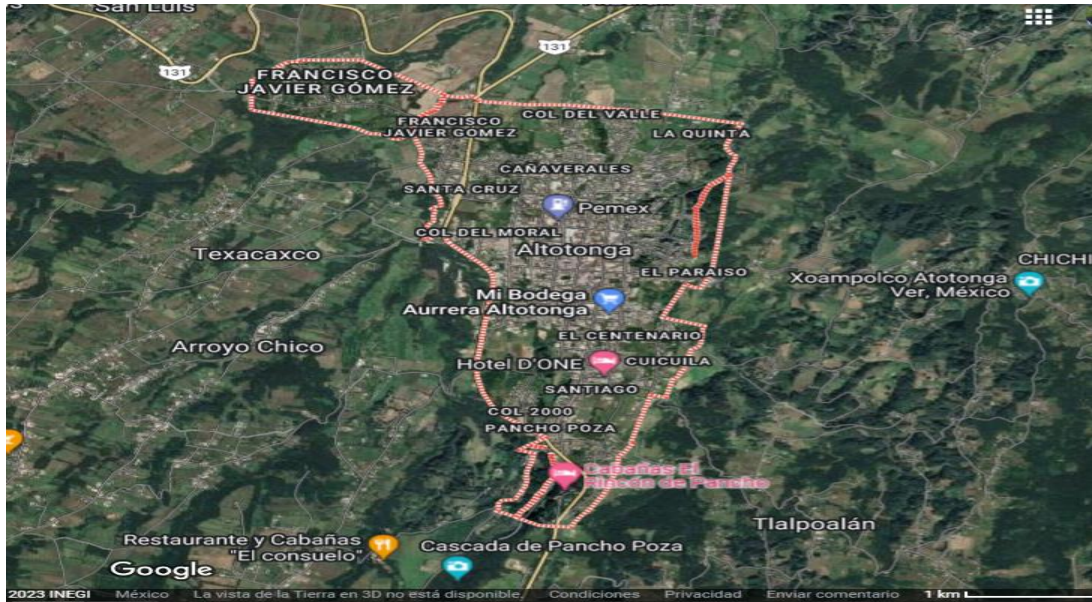
Se obtuvo de un panal silvestre del estado de Guanajuato, localizado a  $20.41^{\circ}$  N y  $100.98^{\circ}$  W, dentro de la comunidad de las Galeras, ubicada en el municipio de Cortázar (**Figura 1**) a una altitud de 1730 m.s.n.m. Este municipio se encuentra en el sur-centro del estado, limita al norte con los municipios de Villagrán y Celaya, al suroeste con Tarimoro, al sur con Salvatierra, al suroeste con Jaral de Progreso y al oeste con Salamanca. Se sabe que la vegetación que rodea a este panal silvestre principalmente es de mezquite *Prosopis laevigata*. (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M.C.Johnst.



**Figura 1:** Vista satelital del Municipio de Cortázar en el estado de Guanajuato. Recuperado de Google Maps.

#### Miel floración ciruela-durazno:

Se obtuvo del estado de Veracruz, en el municipio de Altotonga (**Figura 2**) localizado a  $19^{\circ}45'58''$ N  $97^{\circ}14'44''$ O a una altitud de 2500 m.s.n.m.



**Figura 2:** Vista satelital del Municipio de Altotonga en el estado de Veracruz. Recuperado de Google maps.

### Propiedades organolépticas:

Las propiedades organolépticas, como su nombre lo indica, están basadas en lo que se puede observar y percibir a simple vista, si bien puede ser bastante subjetivo, se ha considerado los criterios con base en la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-004-SAG/GAN-2018.

- **Color:** propio característico derivado de la vegetación de origen, variable de: blanco agua, extra blanco, blanco, ámbar extra claro, ámbar claro, ámbar y oscuro.
- **Olor:** Propio característico derivado de la vegetación de origen.
- **Sabor:** Propio característico derivado de la vegetación de origen.
- **Consistencia:** Fluida, viscosa, total o parcialmente cristalizada.

Estas cuatro características se realizaron con el consenso de 7 personas, donde cada una probó las mieles y mencionó las características percibidas.

- + **Densidad:** se determinó el peso de un volumen determinado de miel y se calculó su densidad con la fórmula

$$\delta = w/v$$

**Donde  $\delta$ :** es la densidad expresada en g/ml

**w:** es el peso de la muestra de miel (g)

**v:** es el volumen de la muestra de miel (ml).

- + **Porcentaje de humedad y grados Brix**

El contenido de agua (%) y sólidos disueltos (grados Brix) se determinó con el equipo RePo-4 marca ATAGO. Donde se calibró con agua destilada y posteriormente se procedió a colocar una poca cantidad (3 mL aproximadamente) de cada miel en el área de muestreo y se realizó la lectura de datos.

+ **Concentración de fructosa y ángulo de rotación.**

Se determinaron con el equipo RePo-4 marca ATAGO. Se realizó el mismo procedimiento antes mencionado para porcentaje de humedad y color.

+ **pH.**

Para determinar el valor del potencial de hidrógeno (pH) se realizó mediante la lectura directa de un potenciómetro marca HANNA modelo HI98103. Se disolvieron 10 gramos de miel en 75 mL de agua destilada y se midió el pH.

+ **Prueba de dextrina.**

En esta técnica se tomó alrededor 50 g de miel fluida, se disolvió en 10 mL de agua destilada y se agregó 3 mL de alcohol al 96%. La dextrina al ser un edulcorante artificial debería reaccionar al alcohol y formar una espuma o una mancha blanca.

+ **Concentración de ácidos orgánicos.**

Se determinó por medio de una titulación (**Apéndice I**) con NaOH 0.01 N. Se disolvieron 10 g de miel en 75 mL de agua destilada y se agregaron 5 gotas de fenolftaleína para la solución problema. En una bureta se colocaron NaOH 0.01 N y se dejó gotear sobre la solución problema hasta que tuvo un viraje que se mantuvo aproximadamente por un minuto. Los mililitros utilizados para el viraje se registraron para hacer los cálculos correspondientes. La determinación se hizo por triplicado (25).

+ **Concentración de carbohidratos reductores.**

Se aplicó el método modificado de Nelson-Somogyi (**Apéndice II**), empleando el reactivo de arsenomolibdato de cobre. Se realizó una extracción de 10 mg de la muestra de miel y se mezcló con 2 mL de etanol al 80%, se colocó en hielo por 15 minutos posteriormente centrifugar a 10,000 rpm por 15 minutos, decantar y evaporar al vacío obteniendo así los carbohidratos en el fondo de los tubos (25)

Posteriormente para su cuantificación se agregó agua destilada, se colocaron los tubos en baño maría por 20 minutos y se enfriaron con agua corriente, se agregó 100 µl de arsenomolibdato, 750 µl de agua destilada y se pasaron a una placa ELISA y se leyeron a 540 nm en el espectrofotómetro y se realizó por triplicado. El estándar para la curva patrón fue la glucosa.

+ **Concentración de proteínas.**



La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976) (**Apéndice III**), por espectrofotometría (595 nm). Se pesó 1g de miel y se disolvió en 4 mL de una solución fría 12:5:3 de metanol-cloroformo-agua (MCA). Se centrifugó a 4500 rpm por 10 minutos y se recolectó el sobrenadante y se agregaron 2 mL más de la mezcla de MCA y se volvió a centrifugar por 10 minutos y se juntó el nuevo sobrenadante con el previamente recuperado. Se agregó 1 mL de cloroformo y 1.5 de agua, se volvió a centrifugar para obtener la parte acuosa de la clorofórmica, se recuperó la fase acuosa, ya que ahí se encuentran las proteínas a cuantificar por el método de Bradford, utilizando una curva patrón de albúmina 100 µg/mL. Se leyó en una placa ELISA a 595 nm. La determinación se hizo por triplicado y se utilizó albúmina para la curva patrón (26).

#### + **Pruebas cualitativas**

Previo a la extracción y cuantificación de compuestos fenólicos y alcaloides se realizaron las pruebas cualitativas para ambas mieles.

Se utilizaron 5 g de miel y se disolvieron en 10 mL de agua y se distribuyeron en 5 tubos de ensayo (2 mL). Para la prueba de fenoles se utilizó cloruro férrico como reactivo, flavonoides se utilizó cloruro de aluminio y para alcaloides primero se tuvo que acidular con HCl 1 N y como reactivos se utilizaron Dragendorff y Mayer.

Se agregaron entre 4 y 5 gotas de cada reactivo en un tubo respectivamente según lo que se buscaba analizar.

#### + **Fenoles, flavonoides, alcaloides.**

La determinación de compuestos fenólicos totales se realizó utilizando el reactivo de Folin Ciocalteu (**Apéndice IV**). Se construyó una curva patrón con ácido gálico (2 mg/ 1 mL) como estándar de referencia, el ensayo se leyó a 725 nm (27).

Se disolvieron 300 mg de miel en 500 µL de agua y se aforó a 1 mL en una probeta, de esa preparación se tomaron alícuotas de 20,50 y 100µL.

El contenido de flavonoides se determinó espectrofotométricamente mediante la reacción de estos con tricloruro de aluminio (**Apéndice V**). Se construyó una curva patrón con quercetina como estándar de referencia, el ensayo se leyó a 415 nm.

Se pesaron 600 miligramos de miel y se disolvieron en 3 mL de metanol, de este stock se tomaron diferentes volúmenes para formar un abanico de concentraciones que se pusieron en contacto con AlCl<sub>3</sub>. Finalmente, después de 30 minutos de reacción el ensayo se leyó a 415 nm (28).

El contenido de alcaloides se determinó utilizando verde de bromocresol (**Apéndice VI**). Se diluyó 1 g de miel en 5 mL de agua, se agregó un buffer, se agregó el verde de bromocresol, neutralizados los alcaloides se agregó cloroformo. Se pasó a una placa ELISA y se leyó a 470 nm

Se construyó una curva patrón con atropina como estándar de referencia, el ensayo se leyó a 470 nm (29).

#### + **Capacidad antioxidante.**

Basado en la reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil (**Apéndice VII**) (DPPH) por parte de la miel para calcular la capacidad antioxidante de ésta al 50% (CA 50).

Se pesaron 10 mg de miel y se disolvieron en 5 mL de metanol grado HPLC siendo el primer stock y se preparó un segundo stock donde se tomaron 20 microlitros del stock 1 y se agregaron 180  $\mu$ L de metanol grado HPLC y se realizó una curva de 1- 1000 ppm llevando a 1 mL los tubos. Se pasaron alícuotas a una caja de ELISA fondo plano, se colocaron 50  $\mu$ L de cada concentración y se agregaron 150  $\mu$ L de DPPH, se incubaron por media hora y se leyeron en espectrofotómetro a 540 nm (30).

#### + **Ácido ascórbico**

A un gramo de miel se le agregaron 4 mL de ácido tricloroacético al 10% y se procedió a homogenizar y se dejó reposar en hielo por 5 minutos y pasado el tiempo se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos (**Apéndice VIII**).

Se tomaron alícuotas y se aforó a 200  $\mu$ L con agua y Folin, Ciocalteau se dejaron reposar por 10 minutos se leyó a 760 nm. Los datos de la absorbancia se interpolaron en una curva patrón de ácido ascórbico (31).

#### + **Actividad antimicrobiana.**

Se realizó a través del método modificado de difusión en agar Kirby-Baüer (32), utilizando como control positivo sensibilizados impregnados con 25 mg de Cloranfenicol. Para evaluar la actividad antimicrobiana de la miel, se cavaron pozos en el agar con la boquilla de pipetas Pasteur (**Figura 3**), que se llenaron directamente con miel hasta llenar el pozo (**Figura 4**). La miel, al difundir por el agar, interacciona con las bacterias en cada ensayo. El efecto se hizo evidente con la aparición de halos de inhibición y reducción del crecimiento, que fueron medidos y cuyos resultados se expresan en milímetros. Se evaluó sobre bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*) y Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*). Se cultivaron las bacterias tanto en caldo como en agar Müeller Hinton ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml). Se realizaron diluciones de 200  $\mu$ L,

del caldo original de bacterias, sobre 10 ml de caldo Mueller Hinton. Las cajas se incubaron a 35 °C durante 24 horas, se observaron y midieron los halos de inhibición al día siguiente (Apéndice IX).



**Figura 3:** Perforación del medio de cultivo con boquillas de pipetas Pasteur



**Figura 4:** Llenado de pozos con las muestras de miel

## Resultados:

### Propiedades organolépticas.

Se llegó a un consenso entre 7 personas, las características percibidas se catalogaron según la NOM 004 y se reportan en el cuadro 1

**Cuadro 1:** Características organolépticas de ambas muestras de miel.

Propiedad	Miel de Guanajuato	Miel floración Durazno-ciruela
Olor	Propio	Dulce
Sabor	Dulce	Propio de la vegetación
Consistencia	Viscosa	Líquida

En el cuadro 2 se reportan las características fisicoquímicas donde se registró un pH ácido para ambas mieles siendo un factor importante que influye en la actividad antibacteriana, también se reportan porcentajes de humedad por debajo del 20% siendo un criterio de calidad importante para la producción y comercio de miel. Los demás valores entran en los parámetros de calidad de acuerdo con la NOM-004.

**Cuadro 2:** Características fisicoquímicas de ambas mieles

Propiedad	Miel Guanajuato	Miel floración durazno- ciruela
Color mm Pfund	86° (ámbar claro)	140 (ámbar oscuro)
Ángulo de rotación	-3.29	-0.08
Concentración de fructosa	59.6 %	53.7%
pH	3.8	4.4
Densidad (g/mL)	1.02 g/mL	1.06g/mL
Porcentaje de humedad (%)	15.2 %	18.2 %
Grados Brix	79.2	80.1

## Propiedades bioquímicas de las muestras de miel.

### Prueba presencia de dextrina.

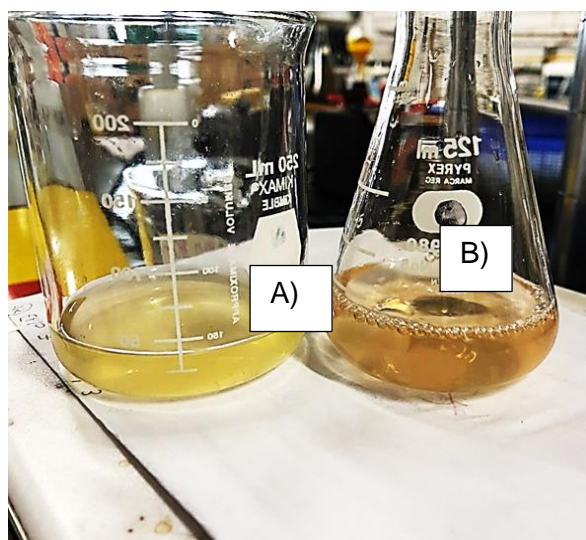
En ambas mieles, de Guanajuato y floración Ciruela durazno, no se observó espuma ni mancha blanca (**Figura 5**) lo que indica que ambas son puras y no contienen dextrina o algún edulcorante.



**Figura 5:** Prueba de dextrina sobre miel. A) se añadió aproximadamente 3 mL de alcohol al 96%. B) muestra de miel posterior al alcohol, no se observó espuma.

### + Cuantificación de ácidos orgánicos.

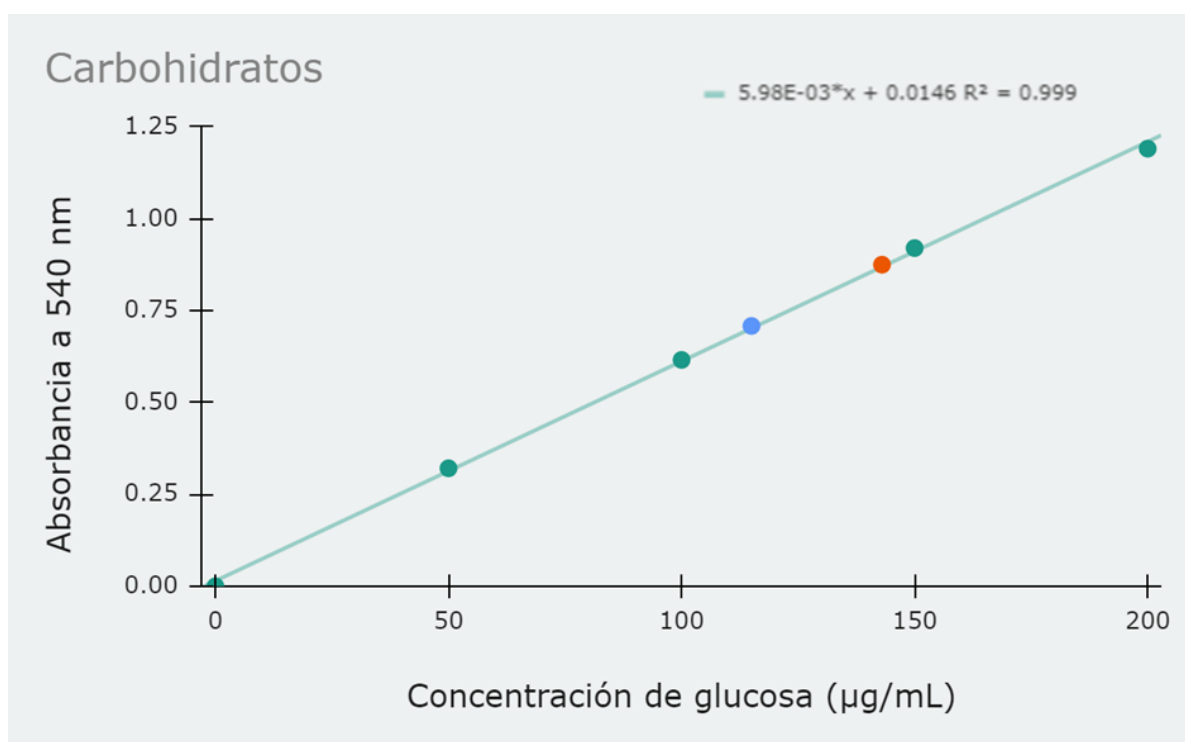
Basado en una reacción de neutralización entre la muestra de miel y sus ácidos orgánicos, llegando al viraje de color rosa pálido (**Figura 6**). Obteniendo como resultado 1.7 meq de Ac.O./ Kg de miel esto para la miel de Guanajuato mientras que la miel de Ciruela Durazno se obtuvo como resultado 5.3 meq de Ac.O/Kg de miel.



**Figura 6:** Cuantificación de ácidos orgánicos. A) muestra de miel antes de añadir la solución neutralizante, B) muestra de miel posterior a añadir la solución y con el vire a color rosa pálido.

+ **Concentración de carbohidratos reductores:**

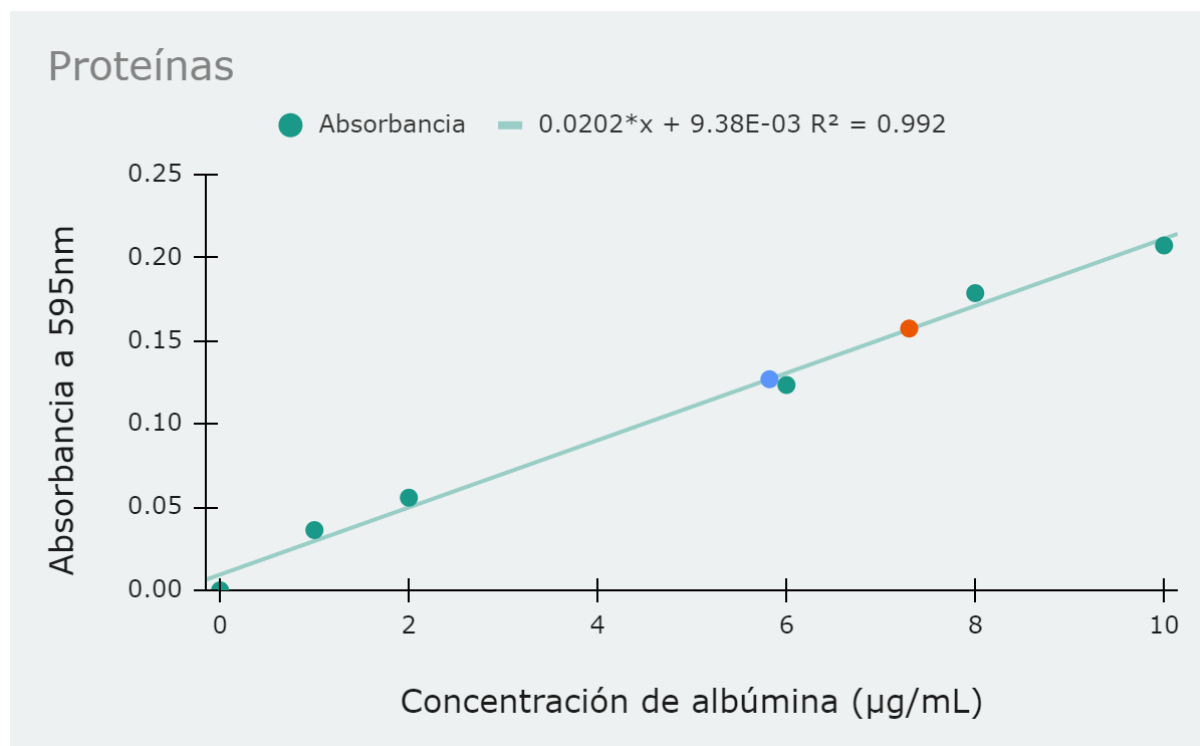
Se realizaron los cálculos y se obtuvo como resultado para la miel de Guanajuato de 58.5% y 72.5% para la miel de floración de durazno-ciruela de carbohidratos reductores. Estos valores se interpolaron en una curva patrón de glucosa (**Figura 7**).



**Figura 7:** Curva patrón de glucosa y absorbancias interpoladas de la miel de panal silvestre (azul) y miel de floración de durazno ciruela (naranja).

#### + **Concentración de proteínas:**

Se realizó por el método de Bradford. Se realizó la curva patrón con albúmina interpolando los valores de ambas mieles y se obtuvo como resultado que la miel de floración de durazno tuvo 0.38 % de proteínas y 0.48 % de proteínas en la miel de Guanajuato (**Figura 8**).

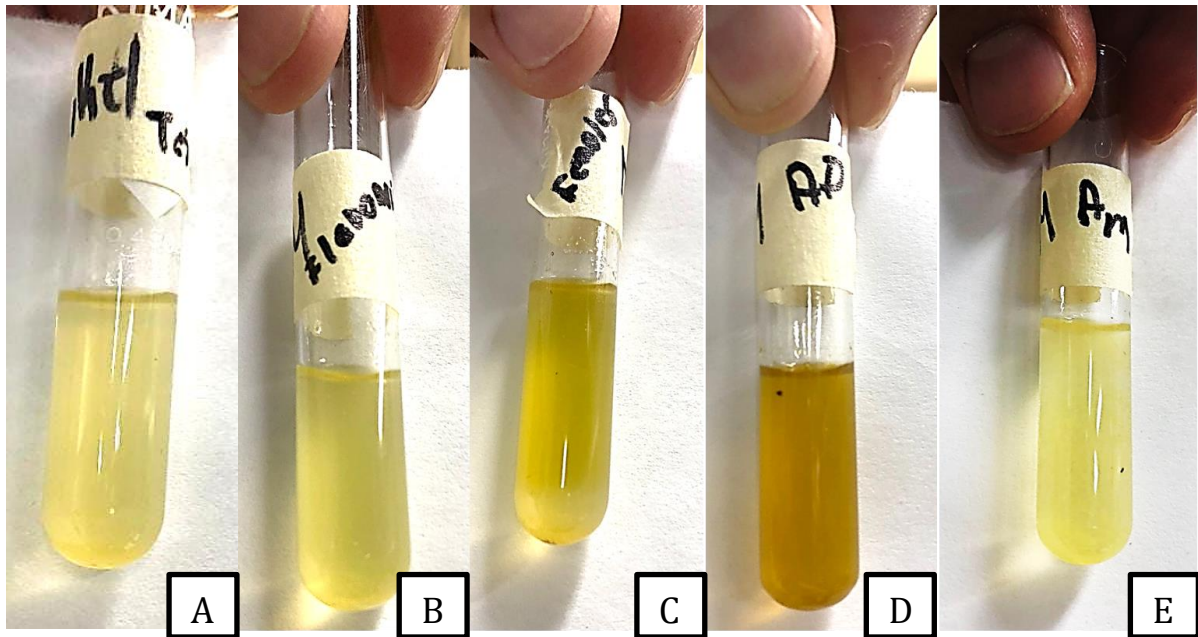


**Figura 8:** Curva patrón de albúmina y absorbancias interpoladas de la miel de panal silvestre (azul) y miel de floración de durazno ciruela (naranja). La concentración de albúmina en µg/mL.

#### + **Determinación cualitativa de metabolitos secundarios (fenoles, flavonoides y alcaloides)**

Posterior a la administración de los reactivos a las muestras de miel se apreció un cambio en la coloración, precipitación y/o consistencia (**Figura 9**) de éstas obteniendo como resultado que, en el caso de la determinación de fenoles se observó un ligero vire de color muy tenue en la parte superior de la muestra al agregar  $FeCl_3$ , interpretándose como presuntamente negativo la presencia de dichos compuestos. Para flavonoides no hubo cambio alguno al agregar  $AlCl_3$  por lo que se asume como poca presencia o ausencia de estos compuestos. En el caso de alcaloides, con Dragendorff se observó un ligero precipitado de color negro, tomando como presuntamente negativo, por el otro lado con el compuesto de Mayer no hubo reacción alguna. Debido a que

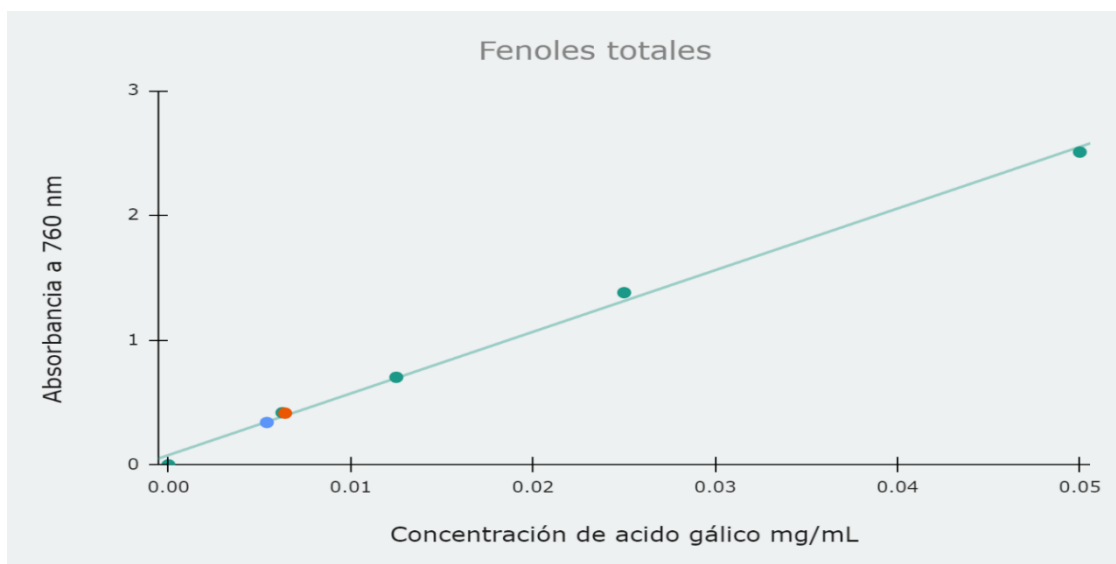
estas pruebas son un poco imprecisas se optó por realizar las pruebas cuantitativas pertinentes para cada metabolito secundario.



**Figura 9:** Pruebas cualitativas en muestras de miel de panal silvestre. A) testigo, B) fenoles, C) flavonoides, D) alcaloides con reactivo Dragendorff y E) alcaloides con reactivo Mayer.

#### + Cuantificación de fenoles totales.

Se realizaron los cálculos correspondientes y se obtuvo como resultado 72 mg eAG/ 100 g de miel y 84 mg eAG/100 g miel, en la miel de Guanajuato y Ciruela Durazno respectivamente. Los valores se interpolaron en una curva patrón de ácido gálico (**Figura 10**).

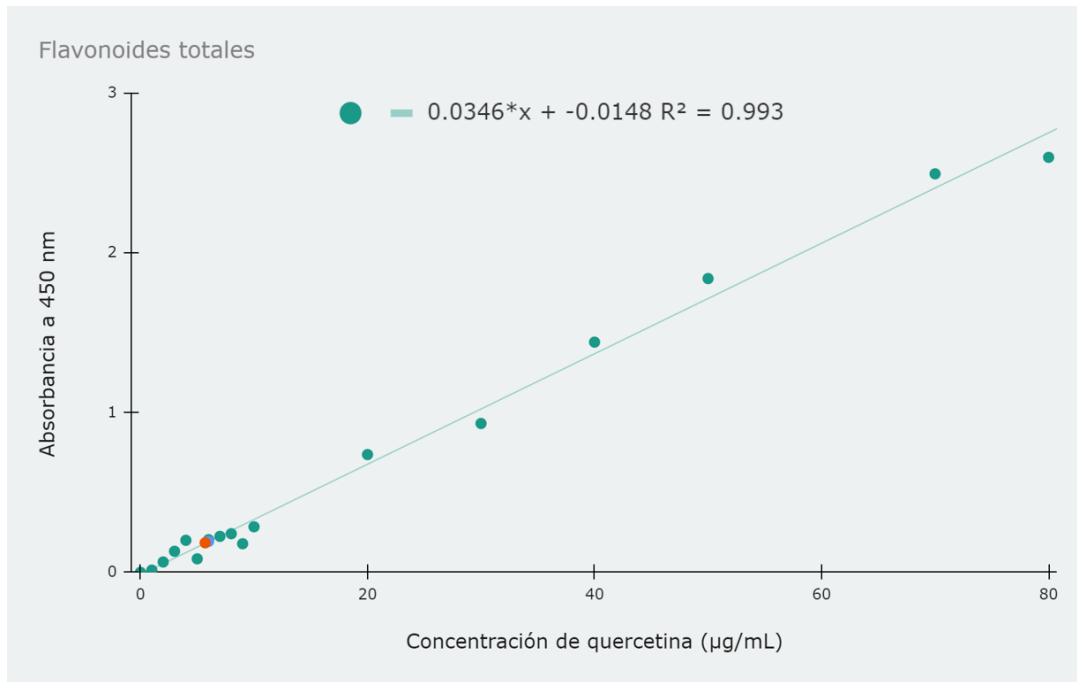


**Figura 10:** Curva patrón de ácido gálico y absorbancias interpoladas de la miel de panal silvestre (azul) y miel de floración de durazno ciruela (naranja).



### + Cuantificación de flavonoides

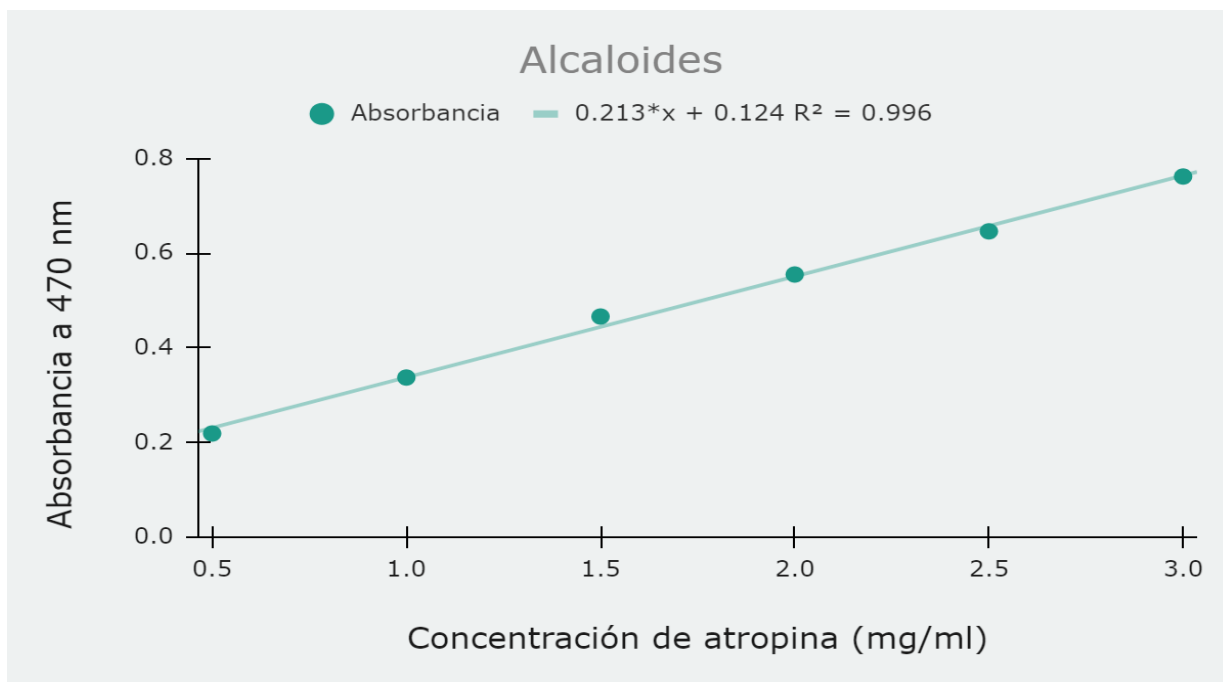
Se determino que los flavonoides están a una concentración de 3.0 mg/ 100 g en la miel de Guanajuato y 2.8mg/100 g ciruela-durazno. Los valores se interpolaron en una curva patrón de quercetina (**Figura 11**).



**Figura 11:** Curva patrón de quercetina y absorbancias interpoladas de la miel de panal silvestre (azul) y miel de floración de durazno ciruela (naranja).

### + Cuantificación de alcaloides.

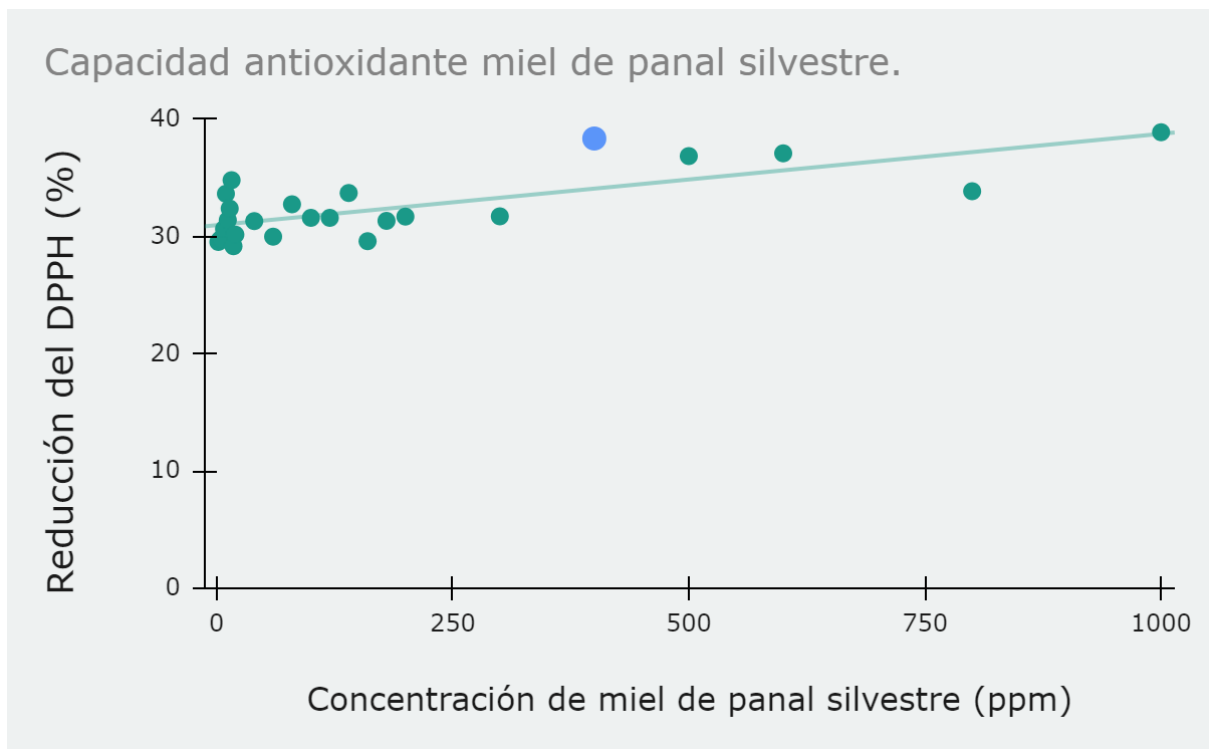
No hubo presencia de alcaloides en ninguna de las mieles. Se realizó la curva patrón de atropina, pero al no presentar alcaloides no se interpolaron valores de las mieles (**Figura 12**).



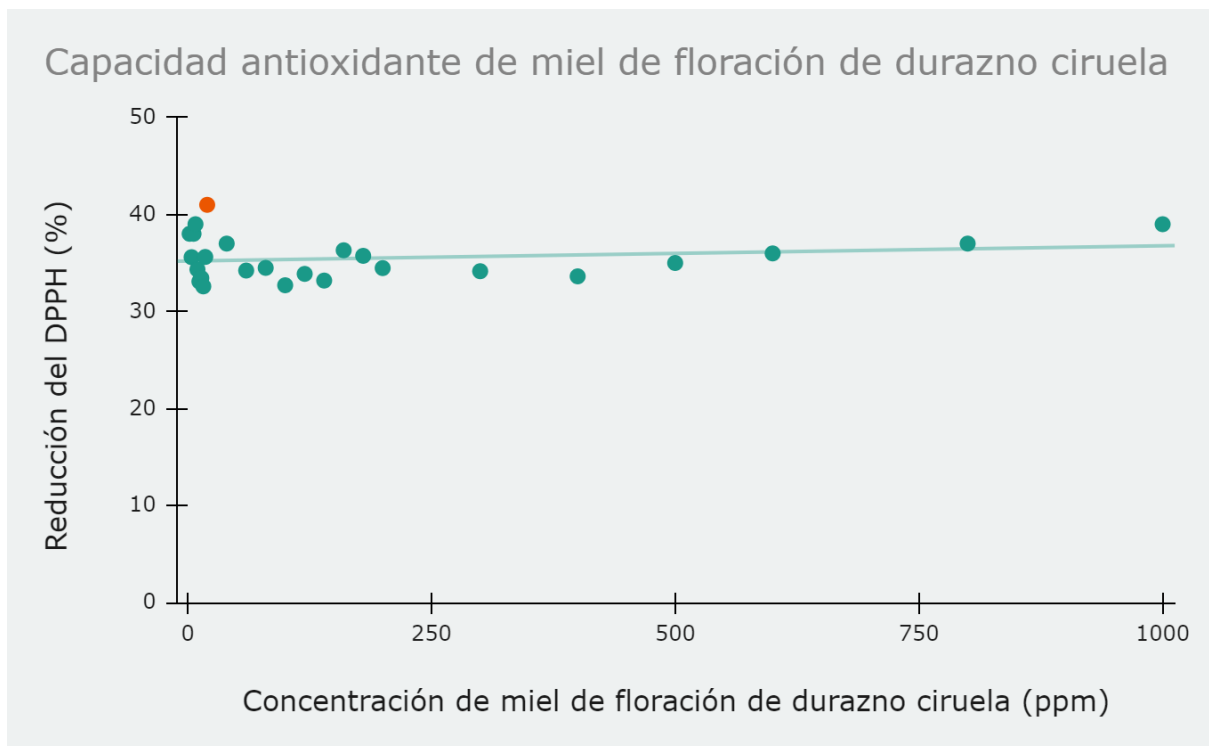
**Figura 12:** Curva patrón de atropina.

+ **Evaluación de la actividad antioxidante por el método de reducción del radical de DPPH (CA 50).**

A través de una reacción colorimétrica entre el radical DPPH y la miel, se puede determinar la capacidad antioxidante de ésta, resultados que en 400 ppm se obtuvo un 38 % de reducción siendo este el porcentaje más alto para la miel de panal silvestre (**Figura 13**) y una concentración de 20 ppm se obtuvo el 40% de reducción para la miel de floración de durazno-ciruela (**Figura 14**).



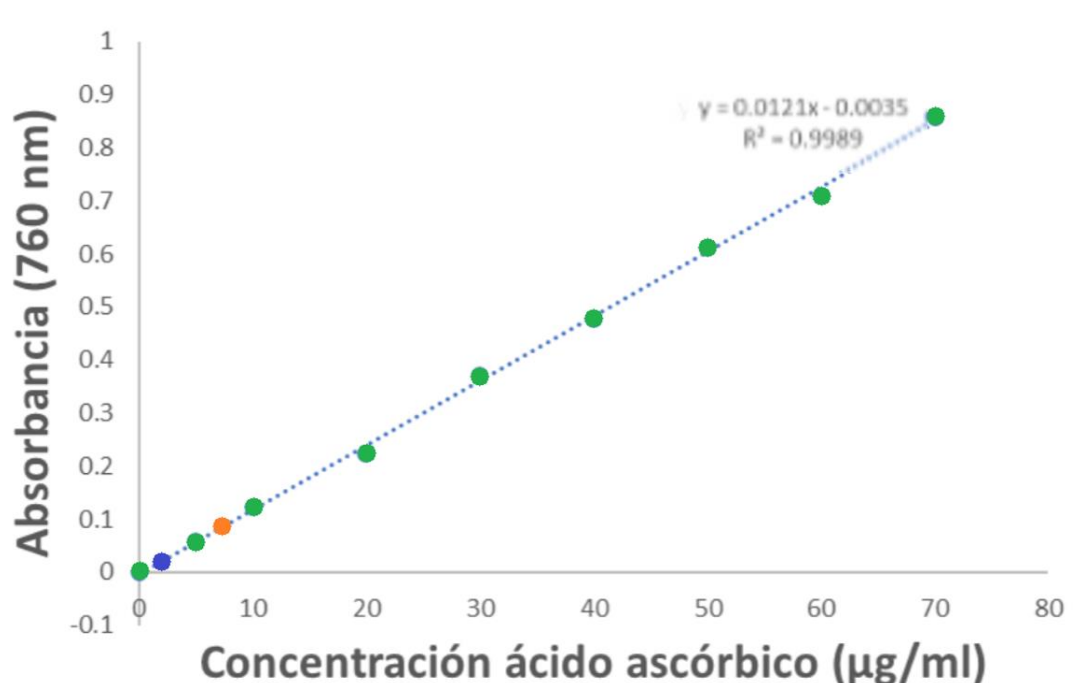
**Figura 13:** Curva de reducción de DPPH de la miel de panal silvestre, señalando el mayor porcentaje de reducción en color azul.



**Figura 14:** Curva de reducción de DPPH de la miel de floración de durazno ciruela, señalando el mayor porcentaje de reducción en color anaranjado

+ **Vitamina C:**

De la extracción y respectiva cuantificación del ácido ascórbico se obteniendo como valores 62.4 mg Vit C/ 100 g para la miel de Guanajuato y 151 mg Vit C/100 g para la miel de floración de durazno ciruela. Los valores obtenidos se interpolaron en una curva patrón de ácido ascórbico (**Figura 15**).



**Figura 15:** Curva patrón de ácido ascórbico y absorbancias interpoladas de la miel de panal silvestre (azul) y miel de floración de durazno ciruela (naranja).

De los valores obtenidos para las pruebas bioquímicas se observó la diferencia entre las mieles donde se observa una mayor cantidad de fenoles, mayor capacidad antioxidante, aunque con muy poca diferencia y una mayor cantidad de ácido ascórbico para la miel de floración de durazno ciruela mientras que para la miel de panal silvestre se obtuvieron valores mayores para proteínas y flavonoides (**Cuadro 3**).

**Cuadro 3:** Valores de pruebas bioquímicas de ambas mieles.

Miel/ análisis	A. Orgánicos/ Kg	CHOOS. Reductores	Proteínas/ 100 g	Fenoles/ 100g	Flavonoides / 100g	Alcaloides /100 g	CA	Vit C/ 100 g
<b>Panal silvestre</b>	1.7 meq Ac.O	58.5 %	0.48 %	72 mg eAG	3.0 mg	---	38 % a 400 ppm	62.4 mg Vit C
<b>Durazno- ciruela.</b>	5.3 meq Ac.O	72.5 %	0.38 %	84 mg eAG	2.8mg	---	40 % a 20 ppm	151 mg Vit C

+ **Actividad antimicrobiana:**

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las mieles se realizaron diluciones de 200 µL, del caldo original de bacterias, sobre 10 ml de caldo Mueller Hinton ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) y se utilizó como control positivo Cloranfenicol.

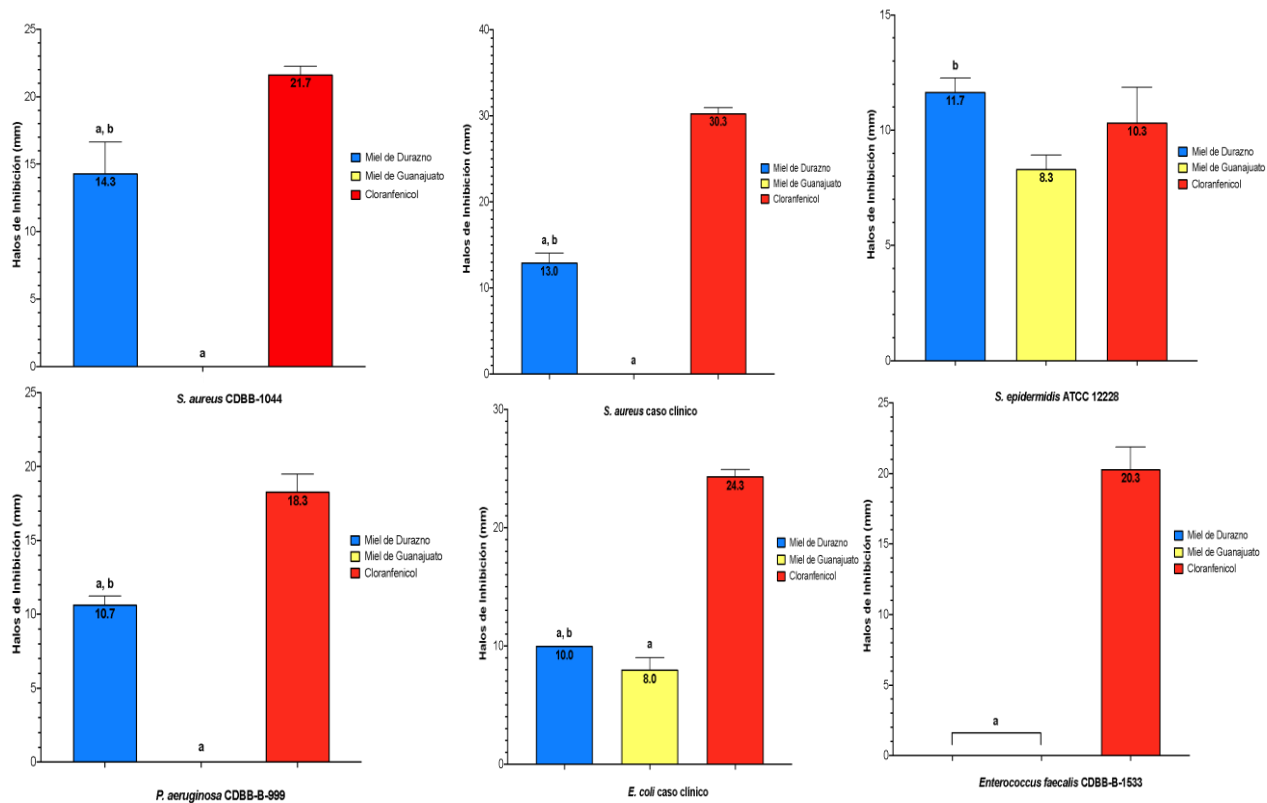
Se realizó el llenado de los pozos con las mieles. Los resultados y análisis estadístico de las medidas de los halos de inhibición (**Figura 16**) se muestran en el cuadro 4.

**Cuadro 4:** Efectos de las muestras de miel sobre el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

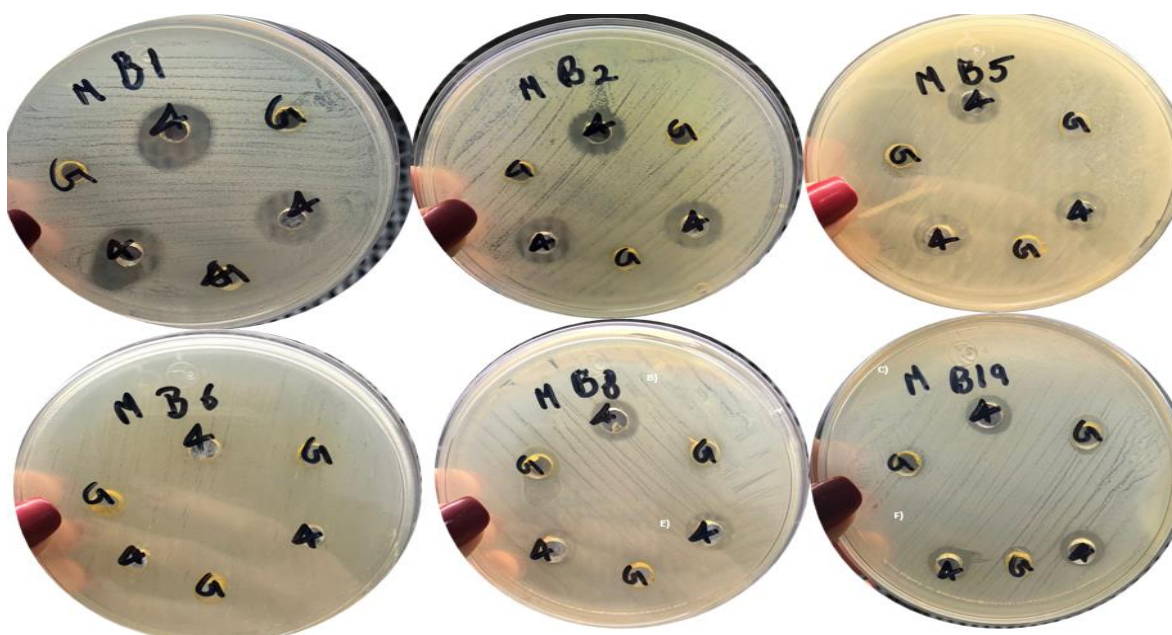
Bacteria	Miel Guanajuato	Miel Durazno	Cloranfenicol
<i>S. aureus</i> (CDBB-1044)	0.0	14.3 ± 2.3 <sup>a,b</sup>	21.7 ± 0.6
<i>S. aureus</i> ( caso clínico)	0.0	13.0 ± 1.0 <sup>a,b</sup>	30.3 ± 0.6
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	8.3 ± 0.6	11.7 ± 0.6 <sup>b</sup>	10.3 ± 1.5
<i>E. faecalis</i> (CDBB-B1533)	0.0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	20.3 ± 1.5
<i>P. aeruginosa</i> ( CDBB-B99)	0.0	10.7 ± 0.6 <sup>a,b</sup>	18.3 ± 1.2
<i>E coli</i>	8.0 ± 1.6 <sup>a</sup>	10.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	24.3 ± 0.6

a: diferencias significativas con respecto al grupo cloranfenicol; b: diferencias significativas entre las dos mieles.

Se realizó el análisis estadístico (ANOVA de una vía), con respecto a las cepas bacterianas *S. aureus* CDBB-1044 ( $P < 0.0015$ ), *S. aureus* caso clínico ( $P < 0.0001$ ) y *P. aeruginosa* ( $P < 0.0001$ ) únicamente la miel de panal silvestre fue la que mostró halos de inhibición que fueron de menor diámetro y mostraron diferencias significativas con el grupo control positivo (cloranfenicol). Con respecto a la actividad sobre *S. epidermidis*, ambas mieles mostraron halos de inhibición y no hubo diferencia significativa con el control positivo ( $P < 0.05$ ); cabe destacar que la miel de durazno mostró halos de mayor diámetro que la de Guanajuato y que si hubo diferencias significativas entre la actividad antibacteriana ( $P < 0.015$ ). En cuanto a la actividad sobre *E. coli*, ambas mieles mostraron halos de inhibición de menor diámetro y fueron significativamente diferentes que el control positivo ( $P < 0.0001$ ), de nuevo la miel de durazno mostró halos de mayor diámetro que la de Guanajuato y significativamente fueron diferentes ( $P < 0.02$ ). Finalmente, ninguna de las mieles presentó actividad sobre *E. faecalis* (**Figuras 16 y 17**).



**Figura 16:** Actividad antibacteriana de la miel de panal silvestre y la de floración de durazno donde se aprecia la diferencia entre ambas mieles y el grupo control. Los datos representan el promedio de cada grupo. Se realizó ANOVA de una vía y la prueba de Tukey para determinar diferencias significativas entre los grupos. a: diferencias significativas con respecto al grupo cloranfenicol; b: diferencias significativas entre las dos mieles.



**Figura 17:** Halos de inhibición de las mieles de panal silvestre (G) y de floración de durazno ciruela (4). Cepas: B1(*S. aureus* CDBB-1044), B2 (*S. aureus* caso clínico), B5 (*S. epidermidis*), B6 (*E. faecalis*), B8 (*P. aeruginosa*) y B 19 (*E. coli*).

## Discusión:

La miel es la sustancia dulce producida por las abejas, ya sea por *Apis mellifera* o Meliponas, a partir del néctar de las flores o de secreciones extra florales. Las abejas la producen a partir de la combinación y transformación de sustancias para posteriormente almacenar y madurar la miel en sus panales (33)

Su uso dentro de la medicina tradicional e incluso actual no es desconocido destacando sus cualidades antigripales y bucofaríngeas en preparados, su acción cicatrizante, laxante, sedativa, antibiótica, antidiarreica, para tratar gastritis, úlceras y afecciones oftalmológicas (34) volviéndola así uno de los productos naturales con mayor relevancia y demanda alrededor del mundo debido a que es un alimento versátil y nutritivo; sin embargo la alta demanda provoca la escasez del producto recurriendo así a la utilización de edulcorantes y/o imitaciones por lo que la importancia del estudio de mieles es vital para la correcta producción, comercialización y en este caso contar con las propiedades adecuadas descritas en la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-004-SAG/GAN-2018 para así asegurar sus calidad y pureza.

En este trabajo se analizaron dos mieles, una de panal silvestre proveniente del estado de Guanajuato y una de floración de durazno ciruela proveniente del estado de Veracruz, se buscó analizar sus propiedades organolépticas, fisicoquímicas, capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana.

Como resultado, se obtuvo que la miel de panal silvestre como tiene un color ámbar claro (86°) sabor dulce, olor propio de la vegetación y consistencia viscosa, mientras que la miel de floración de durazno-ciruela fueron color ámbar oscuro (140°), sabor propio de la vegetación, olor dulce y consistencia líquida. Las características organolépticas de las mieles en general, dependen del contenido de azúcares totales, de su madurez y de la presencia de isoprenoides, carotenos, alcaloides, flavonoides, ácidos orgánicos, glicósidos, aminoácidos, cumarinas entre otros (35), que otorgan propiedades a las mieles de abeja y que definen el sabor y olor de este producto; también el origen floral juega un papel importante en el color del producto (36). La consistencia de las mieles se ve relacionada con la capacidad de cristalizar (37). Con estos resultados se puede observar que ambas mieles presentan propiedades diferentes; características de una miel que proviene fundamentalmente de la región de producción, de la flora utilizada por las abejas y del manejo por el que pasa. El color, sabor, olor y consistencia juegan un papel muy importante en cuanto a la maduración, limpieza de los procesos, humedad entre otros factores (38). El color si bien es un factor importante para la comercialización no es un factor que determine la calidad lo que quiere decir que, aunque una miel sea de un color más oscuro no significa que sea de calidad inferior; cuanto más oscura es la miel, más rica es en fosfato de calcio y en hierro. Las mieles de color claro son más rica en vitamina A y las

oscuros en vitaminas B y C (39), por lo que esto podría explicar el porqué la miel de panal silvestre es color ámbar claro y la miel de floración de durazno es color ámbar oscuro (**Cuadro 1**).

Los resultados obtenidos de ambas mieles fueron clasificados, cumpliendo con los parámetros, según la NOM-004.

Para los parámetros fisicoquímicos se obtuvieron valores dentro del rango de la NOM-004; empezando con el pH. Teniendo un pH ácido para ambas mieles, siendo la miel de panal silvestre más ácida con un pH de 3.8 y un pH de 4.4 para la miel de floración de durazno ciruela (**Cuadro 2**). La acidez, que se debe a la presencia de ácidos orgánicos y que determina un pH bajo, es un factor importante para la actividad antimicrobiana (40) ya que se algunos patógenos necesitan un pH mínimo para desarrollarse como *E. coli* (4.3) o *P. aeruginosa* (4.4) por mencionar unos de los patógenos comunes, de lo contrario no se podrán desarrollar (41). Los valores obtenidos de pH obtenido para ambas mieles son valores que están dentro de los valores más comunes con un rango entre 3.7 a 4.5 incluso hasta con valores de 5, este rango de valores se reporta para diferentes mieles provenientes de diversas partes del mundo incluyendo países como Argentina, Egipto, Colombia y México (42) esta variabilidad de pH indica que el origen geográfico de donde se obtiene la miel, entre otros factores son los que influyen en los parámetros fisicoquímicos. La densidad tiene una estrecha relación con la consistencia de la miel y densidad e influye en el grado de conservación y madurez de la miel (43). Para ambas mieles estudiadas se obtuvieron porcentajes de humedad que entran en el valor máximo (20%) siendo éste un porcentaje estándar para miles de todo el mundo (44), para las mieles analizadas la miel de panal silvestre tuvo una densidad de 1.02g/ml y un porcentaje de humedad de 15.2% mientras que la miel de floración de durazno ciruela tuvo una densidad 1.06g/ml y un porcentaje de humedad de 18.2 % (**Cuadro 2**), ambas mieles poseen valores menores al estándar, lo cual es positivo, pues de sobrepasar este valor la miel es susceptible al crecimiento microbiano como levaduras y mohos desencadenando el proceso de fermentación.

Las abejas tienen la capacidad de transformar azúcares complejos a azúcares más sencillos, esto es posible gracias a la utilización de enzimas presentes en la saliva de las abejas realizando un proceso llamado hidrólisis, convirtiendo así la sacarosa un disacárido, a fructosa y glucosa monosacáridos facilitando su absorción con rapidez en la mucosa intestinal y proporcionan energía inmediata (45). En cuanto a la concentración de fructosa se obtuvieron valores de 59.6 % para la miel de panal silvestre y 53.7% para la miel de floración de durazno ciruela, cumpliendo ambas con la NOM-004 siendo un valor mínimo de 60% conjuntando glucosa y fructosa siendo estos los azúcares que, en su mayoría, componen a la miel. Para los grados Brix o sólidos disueltos se reportaron 79.2% y 80.1% (**Cuadro 2**) para la miel de panal silvestre y la miel de floración de durazno ciruela respectivamente, si bien no existe un estándar para estos valores se han reportado valores similares para miles de *Apis mellifera* provenientes de México reportando valores como 76.7% como mínimo y 89.5% como máximo (46).

En cuanto a los ácidos orgánicos ambas mieles cumplen con los parámetros establecidos, siendo 50 meq Ac.O/kg el valor máximo según la NOM 004, ambas mieles cumplen con el valor estándar, teniendo un valor reportado de 5.3 meq de Ac. O/ kg para la miel de floración



de durazno ciruela mientras que la miel de panal silvestre se reportó un valor de 1.7 meq Ac. O/ kg.

Los carbohidratos reductores reportados para ambas mieles son valores que son considerados como apropiados según otros autores, si bien la miel de panal silvestre tiene un valor menor al estándar, siendo el valor obtenido para ésta de 58.5%/ 100 g , no se considera de fuera del estándar ya que es muy poca la diferencia; mientras tanto la miel de floración de durazno ciruela con un valor reportado de 72.5 % /100 g sí cumple con este estándar que es de valores  $\geq$  60%/100 g esto de acuerdo a la NOM 004.

La concentración de proteínas es baja en ambas mieles, obteniendo como resultado para la miel de floración de durazno ciruela tuvo 0.388% de proteínas y 0.488 % de proteínas en la miel de panal silvestre concordando con otras mieles de diferentes partes del mundo que han sido estudiadas, siendo un valor estándar que puede oscilar entre 0.1% a 0.5% de proteínas las que en su mayoría enzimas son proporcionadas por las abejas al momento de convertir el néctar y también es un valor sujeto al origen floral así como otros factores como la especie de abeja, polen (47).

Los valores de fenoles, flavonoides y alcaloides están sujetos a factores como origen botánico, origen geográfico, condiciones biofísicas de la región, fuente floral, temperatura, clima, especie de abeja y temporada de cosecha (48,49). Es importante el estudio de estos compuestos ya que se les atribuyen propiedades positivas como la capacidad antioxidante.

Los radicales libres son los responsables de la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos lo cual está estrechamente relacionado a afecciones a la salud como cáncer, envejecimiento y mutaciones (50).

La capacidad antioxidante es la capacidad de poder retardar o inhibir la oxidación relacionada con los radicales libres y la neutralización de éstos está relacionada a moléculas biológicas o fitoquímicos que contribuyen a una mejoría en la salud como los flavonoides, alcaloides, fenoles y ácido ascórbico (51), aunque no se restringe solamente a la acción de estos, siendo su concentración relacionados al origen floral entre otros factores (52). Las mieles analizadas reportaron presencia de 3 fitoquímicos. En cuanto a los fenoles la miel de floración de durazno tuvo mayor concentración que la miel de panal silvestre, 72 mg eAG/ 100 g de miel y 84 mg eAG/100 g miel , en la miel de panal silvestre y ciruela durazno respectivamente siendo valores similares reportados en mieles de México, provenientes del estado de Guerrero reportando valores de entre 101.5 mg eAG/100 y 68 mg eAG/100 para miles de color ámbar oscuro, ámbar y ámbar claro (53) así confirmando que está relacionado el color de las mieles así como con la capacidad antioxidante a la cantidad de fenoles, siendo que las mieles más oscuras tienen mayor concentración de fenoles y una mayor capacidad antioxidante (21). Para flavonoides los valores obtenidos fueron de 3.0 mg Q/ 100 g y 2.8 mg Q/ 100 g para la miel de panal silvestre y miel de floración de durazno ciruela (**cuadro 3**) respectivamente siendo valores que concuerdan con datos previamente reportados que oscilan entre 1.42 y 17.75 mg /100 g (11). La presencia de alcaloides pirrolizidínicos en la miel, que son los responsables de afectar la salud tanto de las abejas como del ser humano, ha sido documentada en estudios que se han desarrollado en varios países y reportan diferentes niveles de concentración y orígenes

vegetales de éstos siendo valores muy pequeños que pueden ir desde 0.0017mg/100 g hasta 3.9 mg/100 g (54,55). No se reportó presencia de alcaloides para ambas mieles indicando una buena señal ya que de lo contrario la miel sería un producto tóxico para el consumo humano ya que son compuestos mutagénicos, carcinogénicos y hepatotóxicos si se consumen en grandes cantidades (6). Si bien esta información suena alarmante cabe mencionar que no se han reportado casos de intoxicación por alcaloides presentes en miel y esto debido a la selección floral que tienen las abejas, además del procesamiento que sufre el néctar disminuyendo así las probabilidades de presencia de trazas de alcaloides (56). Conjuntando los metabolitos secundarios se da la capacidad antioxidante donde se obtuvo que la miel de floración de durazno ciruela tuvo una mayor capacidad antioxidante siendo de 40% a 20 ppm (**figura 12**) que la miel de panal silvestre tuvo una capacidad máxima de 38% a 400 ppm (**figura 11**) concordando con lo anteriormente mencionado donde las mieles oscuras contienen mayor cantidad de fenoles proporcionando una mayor capacidad antioxidante. Del mismo modo estos rangos de capacidad antioxidante concuerdan con valores obtenidos de mieles provenientes de diferentes partes de México obteniendo porcentajes de reducción de 74%, 27 % y 18.3 % para mieles de Naranja, Cactáceas y Campanilla (24).

La Vitamina C o ácido ascórbico, perteneciente al grupo de las vitaminas hidrosolubles por lo que no se almacena en el cuerpo por un largo período de tiempo; además, no siendo sintetizada por el ser humano, ésta debe ser consumida por medio de una dieta (57) se han encontrado diversas concentraciones de vitamina C en varias muestras de miel, en las que la concentración de vitamina C oscila entre 0,34 y 75,9 mg/100 g de miel (58). Si bien la miel de floración de durazno ciruela sobrepasa de los valores mencionados anteriormente, esto no afecta en su consumo o en alguna otra propiedad de hecho se reporta que la Vitamina C promueve la actividad antimicrobiana en algunas bacterias (17). La concentración de ácido ascórbico en ambas mieles entra en los rangos que se han descrito en otras mieles siendo el valor obtenido de 151.2 mg Vit C/ 100 g y 62.4 mg Vit C/100 g para las mieles de floración de durazno ciruela y panal silvestre respectivamente.

La miel al ser una solución supersaturada de azúcares, el 84 % una mezcla entre glucosa y sacarosa, crea una fuerte interacción entre las moléculas dejando muy pocas moléculas de agua disponibles, impidiendo el crecimiento de casi cualquier microorganismo, la alta concentración de azúcar provoca la salida de líquidos de los tejidos creando un ambiente aséptico inhibiendo así el crecimiento de microorganismos patógenos (59).

La actividad antimicrobiana en las mieles es multifactorial, siendo unos de los principales factores la acidez, la presencia de peróxido de hidrógeno, así como la presencia de ciertos fitoquímicos que ayudan a la inhibición de microorganismos, otros factores son la alta presión osmótica, la baja actividad del agua, el bajo pH, el bajo contenido en proteínas, alto contenido de azúcares reductores, una viscosidad que limita el oxígeno disuelto entre otros factores (60). Dentro de todos los factores a los que se les atribuye el efecto antibacteriano de la miel se han hecho estudios donde destacan que la presencia de la enzima glucosa-oxidasa que es responsable de la producción de peróxido de hidrógeno y por lo tanto, es la principal causa de la actividad antimicrobiana (61) también los agentes químicos-fitoquímicos o mejor conocidos como metabolitos secundarios como los flavonoides, compuestos aromáticos y los

antioxidantes fenólicos son conocidos por inhibir un amplio rango de bacterias Gram positivas y Gram negativas (62).

Se ha reportado la actividad antimicrobiana de diferentes mieles de diferentes partes del mundo demostrando así un listado de bacterias sensibles al efecto antimicrobiano de la miel entre las que se menciona *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. faecalis*, entre otras (38).

Esta propiedad fue evaluada en bacterias Gram positivas como *S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. faecalis* y Gram negativas como *P. aeruginosa* y *E. coli*; ambas mieles analizadas en este estudio, presentaron efecto inhibitorio (**Figura 14 y 15**) sin embargo la miel de floración de durazno ciruela fue la que tuvo un mayor efecto, actuando en 5 de las 6 cepas utilizadas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* y *E. coli*), mientras que la miel de panal silvestre solamente tuvo efecto en 2 bacterias (*S. epidermidis* y *E. coli*). Cabe destacar que ninguna de las dos mieles tuvo efecto en las cepas de *E. faecalis*

En un estudio realizado en Costa Rica donde evaluaron la actividad antimicrobiana de 25 mieles contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *L. monocytogenes* y *A. niger*, utilizando diluciones de (100, 75, 50, 25, 12.5 y 6.25% v/v) teniendo efecto en 4 de los microorganismos donde concluyeron que se obtuvo un mejor efecto inhibitorio sin diluciones (100 % v/v) teniendo un mayor efecto en las cepas de *S. aureus*, en las demás cepas no hubo un efecto inhibitorio señalando resistencia de cepas como *S. epidermidis* y *L. monocytogenes*. Ninguna de las mieles presentó efecto sobre *A. niger* (22).

Por otro lado, un estudio en España estudió el efecto antibacteriano de 31 muestras de miel sobre diez cepas bacterianas patógenas: *Escherichia coli* O157:H7; *Salmonella enterica* ser. *Typhimurium*; *Shigella sonnei*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Bacillus cereus*; *Listeria monocytogenes*; *Staphylococcus aureus* 9144 y MRSA; *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*, mediante la técnica de difusión en placa. Todas las bacterias Gram negativas excepto *P. aeruginosa* fueron sensibles a todas las muestras de miel (63)

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los de otros estudios previamente mencionados donde se destaca la sensibilidad de ciertas cepas como *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*.

El hecho de que ambas mieles no tuvieran el mismo efecto se debe a las particularidades de cada una de las mieles, así como a la resistencia bacteriana que pueden llegar a presentar las bacterias, del mismo modo el manejo que se le da a las mieles para su cosecha influye mucho, desde la colecta como el almacenaje, temperatura, humedad, etc. En este estudio se obtuvieron valores mayores para la miel de floración de durazno ciruela, como se mencionó el efecto antimicrobiano de la miel es multifactorial, pero de este estudio destaca que la concentración de fenoles, carbohidratos reductores, Vitamina C son factores que influyeron en la actividad, del mismo modo la madurez de las mieles es un factor que puede influir.

## Conclusiones:

- Las 2 muestras de miel son productos puros y cumplen con los parámetros fisicoquímicos descritos en la NOM-004.
- Cada miel tiene propiedades particulares, siendo estas propiedades sujetas al tipo de suelo, floración, clima. Las mieles fueron colectadas en diferentes zonas, a diferentes altitudes también el tipo de manejo que se dio al momento de recolectarlas es un factor que influye.
- Ambas mieles presentaron actividad antioxidante, las mieles son una buena fuente nutritiva inclusive como un antioxidante natural.
- Ambas mieles presentaron propiedad antibacteriana, las mieles pueden ser utilizadas como una alternativa y como un remedio natural antimicrobiano.

## Apéndices

### Apéndice I

Cuantificación de ácidos orgánicos.

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

La normalidad es útil porque se considera que un mol equivalente de ácido neutraliza un mol equivalente de base.

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

#### **Procedimiento:**

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

Los resultados se interpretan de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

$C_1$  = Concentración del titulante de NaOH.

$V_1$  = Volumen de NaOH gastado.

$C_2$  = Concentración de ácidos orgánicos de la muestra problema.

$V_2$  = Volumen de la muestra problema.

## Apéndice II

### Determinación de carbohidratos por el método de Nelson-Somogyi

#### *Extracción de carbohidratos de una muestra de miel.*

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

#### *Cuantificación de carbohidratos*

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

El agente reductor actúa como el factor limitante, por lo que la cantidad de  $\text{Cu}_2\text{O}$  es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra. La sensibilidad es de 25 a 250  $\mu\text{g/mL}$ .

**Cuadro 5:** Concentraciones para preparar curva patrón para la determinación de carbohidratos reductores

Tubo	1	2	3	4	5	6
Patrón de glucosa	-	0.25	0.50	0.75	1.0	-
Agua destilada	1.0	0.75	0.50	0.25	-	-
Reactivo de cobre	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

### Apéndice III

#### Cuantificación de proteínas

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

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

Para la extracción se pesan 1 g de miel y se homogeniza con 4 mL de una mezcla de metanol-cloroformo-agua (12:5:3). Esto se realiza por duplicado, para tener dos tubos con la misma mezcla. Se procede a centrifugar a 4500 rpm por 10 minutos.

La solución stock de albúmina se prepara disolviendo 10 mg albúmina bovina sérica en 1 mL de PBS, y posteriormente, se hace una dilución (tomar 10  $\mu$ L y agregar 990  $\mu$ L de PBS) para alcanzar una concentración de 100  $\mu$ g/mL que será la solución stock para tomar los microlitros que se indican en el Cuadro 5.

Se recupera el sobrenadante para realizar la cuantificación por el método de Bradford.

**Cuadro 6:** Concentraciones para preparar curva patrón para la determinación de proteínas.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7
Albúmina ( $\mu$ g)	10	8	6	4	2	1	-
Stock de albúmina ( $\mu$ L)	100	80	60	40	20	10	
PBS ( $\mu$ L)	60	80	100	120	140	150	160
Reactivo de Bradford ( $\mu$ L)	40	40	40	40	40	40	40

## Apéndice IV

### Método para la determinación de fenoles totales (Método modificado de Singleton).

Para la muestra problema se pesa 300 mg de miel y se disuelve en 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada y se afora a 1 mL en una probeta.

Se construye una curva patrón usando ácido gálico como solución estándar con una concentración de 0.2 mg/mL de la cual se toman alícuotas seriadas de acuerdo con el cuadro 7 a las cuales se les agrega el volumen correspondiente de agua para obtener un volumen de 100  $\mu\text{L}$ . Posteriormente a todos los tubos se les agregan 700  $\mu\text{L}$  de agua, se mezclan perfectamente. A continuación, se adicionan 50  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu, se mezclan perfectamente. Después de cinco minutos, se añaden 150  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (200 g/L) (Cuadro 7)

**Cuadro 7:** Concentraciones para preparar curva patrón para la determinación de fenoles totales.

Tubo	Ácido gálico (mg/mL)	Patrón ácido gálico ( $\mu\text{L}$ )	agua destilada ( $\mu\text{L}$ )	agua destilada ( $\mu\text{L}$ )	reactivo de Folin Ciocalteu ( $\mu\text{L}$ )	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ ( $\mu\text{L}$ )
Blanco	--	--	--	700	50	150
1	0.00625	3.12	96.88	700	50	150
2	0.0125	6.25	93.75	700	50	150
3	0.0250	12.5	87.5	700	50	150
4	0.05	25.0	75.0	700	50	150
5	0.1	50.0	50.0	700	50	150
6	0.2	200.0	0	700	50	150
Problema	--	25.0	75.0	700	50	150
Problema	--	50.0	50.0	700	50	150
Problema	--	100.0	0	700	50	150

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



## Apéndice V

### Determinación de flavonoides totales.

En las plantas, los flavonoides sirven como mecanismo de defensa, y son de interés humano pues son usados para tratar enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios y desórdenes cardiovasculares. Pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos y son derivados del benzopirano. Poseen varios grupos hidroxilos enlazados a estructuras anulares, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, designadas como anillos A, B y C. Dependiendo del grado de oxidación, pueden dividirse en flavonas, flavonoles, flavononas, isoflavonas, flavanos, y antocianinas.

El contenido de flavonoides totales se determina usando una curva patrón de quercetina (0-100 µg/L) de acuerdo con el cuadro 8.

### Preparación de la solución STOCK

1 mg de quercetina-1 mL de MeOH

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

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

Del stock de quercetina (2 mg/2 mL MeOH), tomar 20 µL que llevarán 20 µg, después, agregar 180 mL de MeOH para conseguir un volumen final de 200 µL. De este nuevo STOCK tomar los volúmenes indicados solo para las concentraciones 1 a 4 ppm.

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

**Cuadro 8:** Concentraciones para preparar curva patrón para la determinación de flavonoides.

[ ] ppm	µL STOCK	µL MeOH	(AlCl <sub>3</sub> ) al 2% mL
1	10	990	1
2	20	980	1
3	30	970	1

4	40	960	1
5	5	995	1
6	6	994	1
7	7	993	1
8	8	992	1
9	9	991	1
10	10	990	1
20	20	980	1
30	30	970	1
40	40	960	1
50	50	950	1
60	60	940	1
70	70	930	1
80	80	920	1
90	90	910	1
100	100	900	1
Problema	1 mL	0	1

### Preparación del blanco para la muestra

3 mL de la muestra en solución con 3 mL de metanol sin (AlCl<sub>3</sub>).

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

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

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

## Apéndice VI

### Cuantificación de alcaloides.

La extracción se realizó con 1g de miel diluido en 5 mL de agua.

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

Los valores para realizar la curva patrón de alcaloides basado en la técnica de Shamsa se muestran en el cuadro 9.

**Cuadro 9:** Concentraciones para preparar curva patrón para la determinación de alcaloides.

Tubo	Atropina (mg)	Buffer fosfato (mL)	Verde Bromocresol (mL)
1	0.5	5	5
2	1.0	5	5
3	1.5	5	5
4	2.0	5	5
5	2.5	5	5
6	3.0	5	5

## Apéndice VII

### Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el método de reducción del radical DPPH

Pesar 20 mg de miel y disolver en 10 mL de MeOH HPLC para preparar la solución STOCK. Posteriormente se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de la primera preparación y se agregan 180  $\mu\text{L}$  de MeOH, siendo este el segundo stock 2 posteriormente realiza un gradiente de concentraciones para ver si existe una relación entre la concentración y la actividad antioxidante, de acuerdo con el cuadro 10.

#### Para las concentraciones

Del stock 2 tomar volúmenes indicados solo para las concentraciones 2 a 8 ppm los volúmenes indicados de stock para las concentraciones 10 a 500 ppm se tomaron de la primera solución de stock.

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

[ ]ppm	( $\mu\text{L}$ ) stock	( $\mu\text{L}$ ) Agua destilada
2	10	990
4	20	980
6	30	970
8	40	960
10	5	995
12	6	994
14	7	993
16	8	992
18	9	991
20	10	991
40	20	990
60	30	980

80	40	970
100	50	960
120	60	950
140	70	940
160	80	930
180	90	920
200	100	910
300	150	900
400	200	850
500	250	800
600	300	700
800	400	600
1000	500	500

En una placa de ELISA se colocan por triplicado 50  $\mu$ L de cada concentración, posteriormente, se añade 150  $\mu$ L de la solución metanólica de DPPH cuya concentración final es de 0.004 g/100mL. Se protege inmediatamente de la luz y se incuba por 30 minutos a una temperatura de 37°C. Posteriormente se mide la absorbancia de las reacciones a 540 nm en un lector de ELISA SLT Spectra. El blanco consistió en 200  $\mu$ L de agua.

### **Cálculo del porcentaje de reducción**

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

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

En donde:

C=Absorbancia del DPPH

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

### **Cálculo de la capacidad antioxidante (CA<sub>50</sub>)**

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

## Apéndice VIII

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

*Extracción del ácido ascórbico de una muestra de miel.*

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

*Cuantificación del ácido ascórbico.*

Se prepara la solución problema utilizando alícuotas de 20, 30, 40 y 50 ml del sobrenadante y se diluyen en 180, 170, 160 y 150  $\mu\text{L}$  de agua destilada en conjunto de 20 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, agitando hasta homogeneizar. Para preparar una solución stock de ácido ascórbico se disuelven 1 mg de éste en 10 mL de agua, para posteriormente construir la curva patrón referida en el Cuadro 11.

**Cuadro 11:** Curva patrón para la cuantificación de ácido ascórbico con reactivo de Folin-Ciocalteu

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

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

## **Apéndice IX**

### **Método de difusión en agar**

Método utilizado para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana.

#### **Medio**

Se utiliza caldo Müeller Hinton como medio de cultivo

Con un asa de siembra estéril se tocan las superficies convexas de los microorganismos a ensayar se sumerge y se enjuaga el material en 10 mL de caldo Mueller Hinton El tubo con el caldo inoculados se incuban a 37 °C durante 24 horas. Se ajusta el inóculo para tener una concentración de 1 a 1.5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL.

Posteriormente se inocula la superficie de la placa de agar, sembrando mediante estriado por lo menos en tres direcciones, girando la placa en tres ocasiones a 60°.

Una vez seco el inóculo, se procede a colocar la muestra a la que se le evaluará la actividad antimicrobiana y finalizado el procedimiento se incubaron las placas a 36° por 24 horas.

#### **Aplicación de la miel**

Con la boquilla de una pipeta Pasteur se hacen perforaciones en el agar, buscando abarcar toda la profundidad de la placa. Cada pozo realizado en la placa se llena en su totalidad con la muestra de miel. Finalmente, la sensibilidad de las bacterias se evalúa utilizando sensidiscos impregnados con 25 microgramos de Cloranfenicol como control positivo.

## Bibliografía:

1. Fernández-Riverón, F., López-Hernández, J., Ponce-Martínez, L. M, Machado-Betarte, C., 2003. Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar* (1),32.
2. Elliot TS. Antibacterial resistance in the intensive care unit. Mechanisms and management *Br Med Bull* 1999;55(1):259-76.
3. Harwell JI, Brown R.B., 2000. The drug-resistance *Pneumococcus*. Clinical relevance, therapy and prevention. *Chest*;117(2),530-41.
4. Iyobe S., 1997. Appearance of extended spectrum beta Lactamases. *J Nipón Riwshe* 55(5),1219-24.
5. Davies, J., Welb, V., 1998. Antibiotic resistance in bacteria. En: Krause RM, ed. *Emerging infections biomedical research report*. New York: Academic Press, 239-73.
6. Cortez-Gallardo, V., Macedo-Ceja, J. P., Hernández-Arroyo, M., Arteaga-Aureoles, G., Espinosa-Galván, D., Rodríguez-Landa, J. F., 2004. Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Revista Biomédica* 15(2), 123-136.
7. Córdova Luis, E., 2020. Presencia de metales en miel de abeja como indicador ambiental en el estado de Puebla (Master's thesis, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla)
8. Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., Gallmann, P. 2008. Honey for nutrition and health. *American Journal of the College of Nutrition*. 27: 677-689
9. Ulloa, J. A., Mondragón Cortez, P, Rodríguez Rodríguez, R., Reséndiz Vázquez, J. A., Rosas Ulloa, P., 2010. La miel de abeja y su importancia. *CONACYT*.
10. Haffejee, I. E., Moosa, A., 1985. Honey in the treatment of infantile gastroenteritis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 290(6485), 1866-1867.
11. Principal, J., Barrios, C., Colmenárez, D., Graterol, Z., Fuselli, S., García de La Rosa, S., 2013. Caracterización fisicoquímica y sensorial de mieles de *Apis mellifera* L. en los estados Lara y Yaracuy, Venezuela. *Zootecnia tropical* 31(2), 119-128.
12. 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* (19), 45-51.
13. Martins, H., Martins, L., Bernardo, F., 2003. Bacillaceae spores, fungi and aflatoxins determination in honey Esporos de Bacillaceae, fungos e aflatoxinas em mel. *RPCV*, 98, 85-88.
14. Efem, S., Iwara, CI., 1992. El espectro antimicrobiano de la miel y su importancia clínica. *Infección* 20(4), 227–229.
15. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., 2008. Functional properties of honey, propolis and royal jelly. *Journal of Food Science* 73(9), 117-124.
16. Diario oficial de la Federación. 29 de abril de 2020. Norma Oficial Mexicana NOM-004-SAG/GAN-2018, Producción de miel y especificaciones. 28-53 pp.
17. Maidana José Francisco. *La Miel; características y composición, análisis y adulteración*. Ed. Caro Impresiones. Santiago del Estero-Argentina, 2004
18. Chau Wong, J. (2019). Recognition of adulterated honey with glucose. *Revista Tecnociencia Universitaria Bolivia*, 17.
19. Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO). 2011. *Revista del consumidor*. Junio. No. 412. Pág.30-42
20. Cabrera, L., Ojeda, G., Céspedes, E., Colina, A., 2003. Actividad antibacteriana de miel de abejas multiflorales (*Apis mellifera scutellata*) de cuatro zonas apícolas del Estado Zulia, Venezuela. *Rev Cient* 13(3), 205-211.



21. Al-Mamary, M., Al-Meeri, A., Al-Habori, M., 2002. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research* 22(9), 1041–1047.
22. Estrada, H, Gamboa, Mr, Chaves, C, Arias, M., 2005., Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. *Evaluación de su carga microbiológica. Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 55(2), 167-171.
23. Majtan, J.; Sojka, M.; Palenikova, H.; Bucekova, M.; Majtan, V., 2020. La vitamina C mejora la actividad antibacteriana de la miel contra las bacterias planctónicas e integradas en biopelículas. *Moléculas*, 25, 992.
24. Romero, B., 2018. Caracterización química y evaluación de las actividades antioxidante y antimicrobiana de mieles florales: Naranja, Cactáceas y Campanilla.
25. González, M., Peñalosa, C., 2000. Biomoléculas (Métodos de análisis). Edo. De Méx: Universidad Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
26. García, A., Vázquez, D., 1998. Cuantificación de proteínas: una revisión. *BioTecnología* 3, 77-88.
27. Singleton, V., Orthofer, R., Lamuela-Reventós, R., 1999. Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method. Enzymol.* 152-178.
28. Ramamoorthy, P., 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
29. Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R., Verdian-Rizi, M., 2008. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai Journal Pharmacology Science* 32, 17-20.
30. Scherer, R. Godoy, H. T., 2009 Antioxidant activity index (AAI) By the 2,2,-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food. Chem.* 112, 654–658.
31. Jagota, S., Dani, H., 1982. A New Colorimetric Technique for the Estimation of Vitamin C Using Folin Phenol Reagent. *Anal. Biochem.* 127, 178-182.
32. Vanden, D., Vlietnick, A., 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. *Methods in plant biochemistry* (6), 47-71.
33. Schencke, C., Vásquez, B., Sandoval, C., del Sol, M., 2016. El rol de la miel en los procesos morfofisiológicos de reparación de heridas. *Revista Internacional de Morfología*, 34 (1), 385-395.
34. Ioirish N., 1985. *Las Abejas*, Farmacéuticas Aladas. Moscú: Editorial Mir.
35. Coll Cárdenas, F. J., Villat, M. C., Laporte, G. M., Noia, M. Á., Mestorino, O. N., 2008. Características microbiológicas de la miel: revisión bibliográfica. *Veterinaria Cuyana*, 3.
36. Biloni, R., 2017. Características organolépticas y fisicoquímicas de miel pura en diferentes envases (Doctoral dissertation, Universidad de Concepción del Uruguay--CRR).
37. Gallez, L., 2006. Los colores, aromas y texturas de nuestras mieles. *Revista AgroUNS*, 3(6).
38. The National Honey Board. Honey-Health and Therapeutic Qualities .(The National Honey Board, 390 Lashley Street Longmont, CO 80501-6045 USA). Disponible en: [www.nhb.org/download/factsht/compendium.pdf](http://www.nhb.org/download/factsht/compendium.pdf).

39. Blanco Jr, JW., 1957. La composición de la miel. *Mundo de las abejas*, 38 (3), 57-66.
40. Bogdanov, S., Vit, P., Lüllmann, C., Martin, P., Von der Ohe, W., Russmann, H., Gelli, D., 2000. Calidad de la miel de abejas y estándares de control: revisión realizada por la comisión internacional de la miel: sugerencias para las normas venezolanas. *Rev. Fac. Farm. (Mérida)*, 26-36.
41. Olaitan P.B., Adeleke O.E., Ola I.O., 2007. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitor agent for microbes. *African Health Science*. 7: 159-165.
42. Campo-Barrera, O. I., Hincapié-Llanos, G. A., 2023. Factores que determinan las propiedades fisicoquímicas de la miel de abejas: Revisión Sistemática de Literatura. *Mutis*, 13(1). 1-28.
43. González, G., González, C., Pérez, S. Gómez, O., 1995. Características fisicoquímicas de la miel producida en el estado de Durango. IX Seminario de Apicultura. Instituto Politécnico Nacional-Centro De Investigación En Biotecnología Aplicada.
44. Córdova C., Ramírez A., Martínez H. & Zaldívar C., 2013. Caracterización Botánica de Miel de Abeja (*Apis mellifera L.*) de cuatro regiones del Estado de Tabasco, México, mediante técnicas Melisopalínológicas. UNAM. Universidad y Ciencia. Trópico Húmedo. 29 (1), 163-178.
45. Salamanca-Grosso G, Osorio-Tangarife MP, Reyes-Méndez LM., 2017. Propiedades fisicoquímicas de mieles monoflorales de encenillo de la zona andina en Boyacá, Colombia. *Artigo Quím Nova*.40(8):854-64.
46. Castillo Martínez, T., García Osorio, C., García Muñoz, J. G., Aguilar Ávila, J., Ramírez Valverde, R., 2022. Sugars and ° Brix in honey from *Apis mellifera*, *Melipona beecheii*, and commercial honey from a local market in Mexico. *Veterinaria México OA*, 9.
47. García-Chaviano, M. E., Armenteros-Rodríguez, E., Escobar-Álvarez, M. D. C., García-Chaviano, J. A., Méndez-Martínez, J., Ramos-Castro, G., 2022. Composición química de la miel de abeja y su relación con los beneficios a la salud. *Revista Médica Electrónica*, 44(1), 155-167.
48. Kek, SP., Mentón, NL., Yusof, YA., Tan, SW., Chua, LS., 2014. Contenido fenólico total e intensidad del color de las mieles malasias de *Apis* spp. y *Trigona* spp. Abejas. *Agric. Agric. Sci. Procedia*, 2, 150-155.
49. Jibril, F.I., Hilmi, A.B.M., Manivannan, L., 2019. Aislamiento y caracterización de polifenoles en miel natural para el tratamiento de enfermedades humanas. *Toro. Natl. Res. Centavo*. 43(4).
50. Benítez-Estrada, A, Villanueva-Sánchez, J, González-Rosendo, G, Alcántar-Rodríguez, V, Puga-Díaz, R, Quintero-Gutiérrez, A., 2020. Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP). *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 23, e20200244.
51. Galleano M., Verstraeten S.V., Oteiza. P.I., Fraga C., 2010. Antioxidant actions of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 501: 23-30.
52. Alvarado-Avila, L. Y., Moguel-Ordóñez, Y. B., García-Figueroa, C., Ramírez-Ramírez, F. J., Arechavaleta-Velasco, M. E., 2022. Presencia de alcaloides pirrolizidínicos en miel y los efectos de su consumo en humanos y abejas. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 13(3), 787-802
53. Mendoza-Bacilio, CI, Epifanio-Gómez, R, Yam-Puc, A, Avila-Caballero, LP, Palemon-Alberto, F, Torres-Guzmán, F, Bello-Martínez, J., 2022. Color influence on

- phenolic compounds and bioactive properties of honey from Guerrero, Mexico. *Biotechnia*, 24(2), 5-11.
54. Betteridge K, Cao Yu, Colegate S., 2005. Improved method for extraction and LC-MS analysis of pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides in honey: Application to *Echium vulgare* honeys. *J Agric Food Chem* ;53:1894–1902.
  55. Deinzer ML, Thompson PA, Burgett DM, Isaacson DL., 1977. Pyrrolizidine alkaloids: Their occurrence in honey from tansy ragwort (*Senecio jacobaea* L.). *Science*;795:497-499
  56. Reinhard, A., Janke, M., von der Ohe, W., Kempf, M., Theuring, C., Hartmann, T., Beuerle, T., 2009. Feeding deterrence and detrimental effects of pyrrolizidine alkaloids fed to honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of chemical ecology*, 35, 1086-1095.
  57. Álvarez-Suárez, JM, Tulipani, S., Romandini, S., 2010. Contribución de la miel en la nutrición y la salud humana: una revisión. *Mediterr J. Nutr Metab* 3, 15–23.
  58. Verghese, R.J.; Mathew, S.K., David, A., 2017. Antimicrobial activity of vitamin C demonstrated on uropathogenic *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Curr. Res. Sci. Med.* , 3, 88–93
  59. Brudzynski k., 2006 Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Canadian Journal of Microbiology*., 52. 1228-1237.
  60. Ramírez J, Calderón R, Ortiz R, Sánchez L., 2003. Manual de Apicultura. Programa de Publicaciones e Impresiones de la Universidad Nacional, Costa Rica. Tomo I, 44-77.
  61. Cooper RA, Molan PC, Harding K., 2002 The sensitivity to honey of gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *J Applied Microb.* 93: 857-863.
  62. Machado De-Melo, A., Almeida-Murandian, L., Sancho, M. T., Pascual-Maté, A., 2017. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of apicultural research*. 57(13): 1-33.
  63. Gallardo-Chacón, JJ, Caselles, M., Izquierdo-Pulido, M., Rius, N., 2008. *Actividad inhibidora de mieles monoflorales y multiflorales frente a patógenos bacterianos*. *Revista de investigación apícola*, 47 (2), 131–136