



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Maestría en Ciencia de los Alimentos

T E S I S

Análisis de la actividad antioxidante, gastroprotectora, hepatoprotectora y antiinflamatoria de extractos de miel de abejas sin aguijón (*Melipona beecheii*) mediante ensayos *in vitro*

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

P R E S E N T A

Lic. Marycarmen Cortes Hernández

Directores

Dr. Rubén Jiménez Alvarado

Dra. Gabriela Medina Pérez

Asesores

Dr. César Uriel López Palestina

Dra. Lorena Luna Rodríguez

Dra. Diana Patricia Carreón Camacho

Tulancingo de Bravo Hidalgo., junio del 2024



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Agropecuarias
School of Forestry and Environmental Studies
Maestría en Ciencia de los Alimentos

COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos
Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: "Análisis de la actividad antioxidante, gastroprotectora, hepatoprotectora y antiinflamatoria de extractos de miel de abejas sin aguijón (*Melipona beecheii*) mediante ensayos *in vitro*", que desarrolla la estudiante Marycarmen Cortes Hernández

Asistentes:

Dr. Rubén Jiménez Alvarado
Dra. Gabriela Medina Pérez
Dr. César Uriel López Palestina
Dra. Lorena Luna Rodríguez
Dra. Diana Patricia Carreón Camacho

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante, comunicando a la estudiante, **Marycarmen Cortes Hernández**, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. La estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que el estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 02 de julio de 2024

Dr. Rubén Jiménez Alvarado
Dra. Gabriela Medina Pérez
Dr. César Uriel López Palestina
Dra. Lorena Luna Rodríguez
Dra. Diana Patricia Carreón Camacho



Handwritten signatures and initials in blue ink on a grid background.



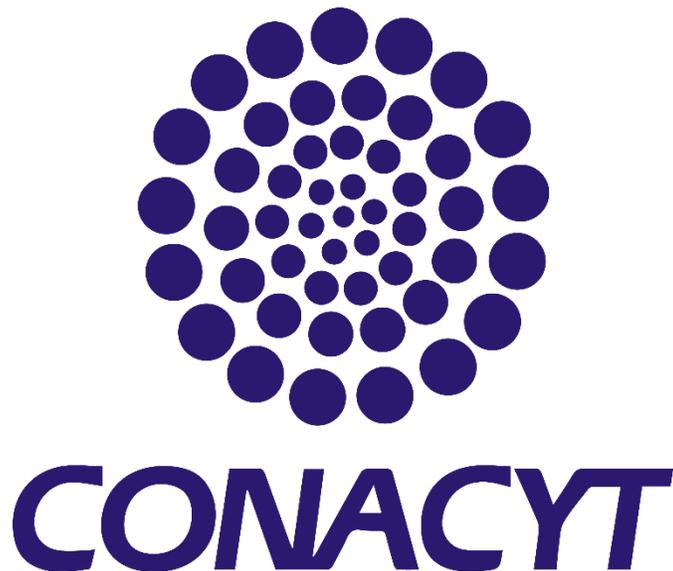
Avenida Universidad Km. 1 s/n, Exhacienda Aquetzalpa,
Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México; C.P. 43600
Teléfono +52 (771) 71 72000 ext. 2425
maestria_alimentos@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada a la alumna Marycarmen Cortes Hernández (No. De CVU: 1234002) para la realización del proyecto “Análisis de la actividad antioxidante, gastroprotectora, hepatoprotectora y antiinflamatoria de extractos de miel provenientes de abejas sin aguijón (*Melipona beecheii*) mediante ensayos *in vitro*”.

Al proyecto 321293 titulado Fortalecimiento de los circuitos justos de producción-consumo de los productos de la colmena de las abejas nativas. Proyecto apoyado por el CONACyT en el año 2022. En el marco de los “Proyectos Nacionales de Investigación e Incidencia para la Soberanía Alimentaria”, del programa presupuestario F003 “Programas Nacionales Estratégicos de Ciencia Tecnología y Vinculación con los Sectores Social, Público y Privado”



DEDICATORIA

A Dios gracias, por haberme dado la oportunidad de terminar un grado más en mi trayectoria profesional, por darme sabiduría, sostenerme y acompañarme en cada momento, por guiar cada uno de mis pasos y no soltarme.

Dedico este trabajo a mi Madre, que siempre me ha brindado su apoyo incondicional y ha creído en mí, por su amor y dedicación constante, por ser el pilar de mi vida.

A mi hermano Amed, por su apoyo y cariño, porque sin su ayuda no podrá haber hecho posible tantas cosas y logros.

A Gabito, mi hermano por recordarme que siempre se puede ser alegre e inocente, por cada risa y momento juntos.

A Dani, mi compañero de vida, por apoyarme, creer en mí, alentarme cada día y saber que sin importar lo que pase siempre estará ahí cuando ya no puedo más, por su amor incondicional y paciencia.

A la Dra. Gabriela Medina, por ser mi inspiración para la realización de este posgrado y despertar en mí el amor por la ciencia, por guiarme en cada momento, por ser mi mentora y amiga, por todo su apoyo y tiempo dedicado a mi trayectoria profesional y personal

Al Dr. Rafael G. Campos, gracias por todo su apoyo brindado, por cada consejo y momento pasado, espero que desde el cielo continúe guiándonos para no dejar de ser colmilludos.

A mi papá abuelito Jorge, por haber estado conmigo desde siempre, por su gran amor, por su carisma y apoyo, te extraño.

A mi mamá Gude, por su amor, su apoyo y recibirme siempre con gusto.

A la Sra. Fany por preocuparse por mí, por su cariño y su apoyo.

""Porque por la gracia de Dios soy lo que soy; y su gracia no ha sido en vano para conmigo, antes ya he trabajado duro pero no yo, sino la gracia de Dios conmigo" -1Corintios 15:10-

Resumen

Los productos naturales debido a su estructura química muestran un fuerte potencial de unión contra una amplia variedad de enzimas. La miel de abejas sin aguijón es un producto natural muy valorada debido sus numerosos efectos benéficos a la salud. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los parámetros fisicoquímicos, compuestos bioactivos y actividad antioxidante de extractos de miel de abejas sin aguijón (*Melipona beecheii*) frente a tres enzimas (ureasa, elastasa y β -glucuronidasa) como indicadoras de los efectos gastroprotector, antiinflamatorio y hepatoprotector respectivamente mediante pruebas *in vitro*. Se utilizaron cinco mieles en este estudio, proporcionadas por el Sistema de Producción de Abejas Nativas del estado de Veracruz, México. Se determinaron los parámetros de humedad, pH, acidez libre, conductividad eléctrica, °Brix, índice de refracción y color, por medio de distintos métodos analíticos. El contenido de fenoles y flavonoides totales mediante el método de Folin-Ciocalteu y el método de Tricloruro de aluminio respectivamente. La capacidad antioxidante se determinó mediante la inhibición de los radicales libres ABTS y DPPH. Finalmente se hicieron pruebas de inhibición contra las enzimas ureasa, elastasa y β -glucuronidasa. Los resultados para el contenido de humedad oscilaron entre el 24.25 y 29.66%, pH 3.33 hasta 4.46, acidez libre de 23.52 a 56.70 meq/kg, conductividad eléctrica, °Brix e Índice de refracción fueron de 174.67 al 521.67 $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$, 71 al 47 g/100g y 1.46 al 1.47 respectivamente y colores blanco, ámbar claro y ámbar oscuro, se obtuvieron valores entre 9.27-31.80 mg EAG/100 g y 1.98-4.14 mg EQ/100 g de miel para fenoles y flavonoides, porcentajes de inhibición frente a los radicales ABTS y DPPH de 16.60-47.08% y 31.74-50.67% y valores de inhibición para las enzimas ureasa (45-85%), elastasa (40-27%) y β -glucuronidasa ($\geq 80\%$), se concluyó que las mieles de abejas sin aguijón poseen diferentes variaciones en cuanto a su composición fisicoquímica, el contenido de compuestos bioactivos de estas se ven afectados por el origen floral, clima, estación del año y forma de cosecha, así mismo la actividad antioxidante se relacionó al efecto sinérgico de varios de sus componentes y no únicamente al contenido de fenoles y flavonoides. Finalmente la actividad inhibitoria de los extractos de miel se relacionó al efecto sinérgico de los fenoles y flavonoides así como de otros componentes de la miel tales como, ácidos orgánicos, aminoácidos, enzimas y minerales.

Abstract

Due to their chemical structure, natural products demonstrate a strong binding potential against a wide variety of enzymes. Honey derived from stingless bees is a highly valued natural product due to its numerous beneficial health effects. The aim of the present was to evaluate the physicochemical parameters, bioactive compounds and antioxidant activity of honey extracts from stingless bees (*Melipona beecheii*) against three enzymes (urease, elastase and β -glucuronidase) was in order to determine the anti-inflammatory, gastroprotective, and hepatoprotective effects through in vitro assays. Five honeys were utilized in this study, provided by the Native Bee Production System of the state of Veracruz, Mexico. The parameters of humidity, pH, free acidity, electrical conductivity, °Brix, refractive index, and color were determined by means of different analytical methods. The content of phenols and total flavonoids were quantified using the Folin-Ciocalteu method and the aluminum trichloride method. Antioxidant capacity was evaluated through the inhibition of free radicals, ABTS and DPPH. Inhibition tests were conducted against the enzymes urease, elastase and β -glucuronidase. The results for the moisture content ranged from 24.25 to 29.66%, with a pH of 3.33 to 4.46, free acidity from 23.52 to 56.70 meq/kg, electrical conductivity from 174.67 to 521 μ S/cm, °Brix from 17.46 to 52.10, and refractive index from 1.46 to 1.47. The electrical conductivity was 0.67 μ S/cm, the moisture content was 71%, the pH was 4.7, and the free acidity was 1.46 to 1.47. The honey exhibited white, light amber, and dark amber colors, with values between 9.27 and 31.80 mg EAG/100 g and 1.98 and 4.14 mg. The results indicated that the honey samples exhibited varying levels of phenols and flavonoids, with inhibition percentages against ABTS and DPPH radicals ranging from 16.60 to 47.08% and 31.74 to 50.67%, respectively. Additionally, the inhibition values for the enzymes urease, elastase, and β -glucuronidase exhibited considerable variability, with values ranging from 45 to 85%, 40 to 27%, and \geq 80%, respectively. The content of bioactive compounds is affected by the floral origin, climate, season of the year and method of harvest. Likewise, the antioxidant activity was related to the synergistic effect of several of its components and not only to the content of phenols and flavonoids. Finally, the inhibitory activity of honey extracts was found to be related to the synergistic effect of phenols and flavonoids, as well as other components of honey, including organic acids, amino acids, enzymes, and minerals.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. MARCO TEÓRICO	12
2.1 Miel.....	12
2.1.1 Clasificación	12
2.2 Abejas sin aguijón.....	13
2.2.1 Cultivo de abejas sin aguijón en México	14
2.2.2 Composición química de la miel de abejas sin aguijón	15
2.2.3 Compuestos bioactivos presentes en la miel de abejas sin aguijón	16
2.2.4 Efectos benéficos a la salud de la miel de abejas sin aguijón.....	17
2.2.5 Antecedentes acerca de la miel de abejas sin aguijó	18
2.3 Enfermedades gástricas	19
2.4 Enfermedades inflamatorias	21
2.5 Enfermedades hepáticas	23
2.6 Enzimas implicadas en enfermedad	25
2.6.1 Ureasa	25
2.6.2 Elastasa	26
2.6.3 β -Glucuronidasa.....	27
3 JUSTIFICACIÓN.....	29
4 HIPÓTESIS	30
5 OBJETIVOS.....	31
5.2 Objetivos específicos.....	31
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
8 CONCLUSIONES.....	49
9 BIBLIOGRAFÍA.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Composición química de miele de abejas sin aguijón	16
Figura 2 Producción de ureasa por <i>Helicobacter pylori</i> y su incidencia en el desarrollo de enfermedades gástricas	20
Figura 3 Metabolismo de fármacos en el hígado	25
Figura 4 Efecto de la elastasa sobre el desarrollo de inflamación crónica.....	27
Figura 5 Implicación de la β -glucuronidasa en la toxicidad hepática	28
Figura 6 Porcentaje de inhibición de la enzima Ureasa con respecto a la dosis de extracto	45
Figura 7 Porcentaje de inhibición de la enzima Elastasa con respecto a la dosis de extracto	47
Figura 8 Porcentaje de inhibición de la enzima β -glucuronidasa con respecto a la dosis de extracto	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Compuestos bioactivos presentes en la miel de abejas sin aguijón	17
Tabla 2 Información de las mieles de abejas sin aguijón del estado de Veracruz, utilizadas en este estudio.....	32
Tabla 3 Clasificación del color de las mieles de acuerdo con la escala de Pfund	35
Tabla 4 Estándares de calidad para las mieles de abejas sin aguijón	41
Tabla 5 Parámetros fisicoquímicos de las mieles abejas sin aguijón (<i>Melipona beecheii</i>).41	
Tabla 6 Contenido de flavonoides, fenoles y actividad antioxidante de las muestras de miel de abejas sin aguijón (<i>Melipona beecheii</i>).....	44
Tabla 7 Correlación entre el contenido de compuestos bioactivos, actividad antioxidante y potencial inhibitorio de los extractos de miel de abejas sin aguijón (<i>Melipona beecheii</i>) ...	46

1. INTRODUCCIÓN

Se ha visto que persiste el aumento de enfermedades no transmisibles en la población mundial, inclusive se han detectado nuevas prevalencias hacia padecer otras enfermedades como las gástricas, inflamatorias y hepáticas. Estas enfermedades tienen su etiología en diversos factores, siendo las más comunes el estilo de vida, los malos hábitos alimenticios, el consumo excesivo de sustancias nocivas y ciertos medicamentos, incrementando así el desarrollo de úlceras, gastritis, daños hepáticos, e inflamaciones en múltiples tejidos. Como respuesta, se ha optado por aumentar el consumo de alimentos naturales con propiedades terapéuticas y funcionales con la finalidad de prevenir y tratar algunas de estas enfermedades y que por medio de estos se contribuya a reducir el consumo de medicamentos y mejorar el estado de salud de la población (Encinas Sotillos et al., 2017; Hernández Cortez et al., 2019; Leoz et al., 2016).

Los productos naturales debido a su estructura química muestran un fuerte potencial de unión con algunas estructuras biológicas, lo que les permite interactuar y unirse a una amplia variedad de enzimas (Pereira et al., 2017), pudiendo ser efectivos para la inhibición de algunas enzimas involucradas en algunos procesos patológicos como los antes mencionados.

Dentro de las abejas productoras de miel, existen dos grandes grupos: las abejas pertenecientes a los géneros *Apis* y *Meliponini*, estas últimas son mejor conocidas como “abejas sin aguijón” o “abejas nativas”. La miel de estas abejas ha sido muy valorada por diferentes países en donde se produce y cosecha, debido a que, le son atribuidos numerosos efectos benéficos a la salud, por lo que su uso ha sido exclusivamente con fines terapéuticos y medicinales (Costa dos Santos et al., 2021). Tradicionalmente se le ha empleado para tratar desde quemaduras y heridas, hasta infecciones, trastornos gastrointestinales y enfermedades oculares. La investigación científica que se ha realizado en torno a este tipo de mieles va principalmente relacionada a su composición química y funcional, donde se ha encontrado que posee características únicas a comparación de la miel comercial proveniente de *Apis mellifera* (Pimentel et al., 2022).

Además algunos estudios ya han comprobado su carácter funcional evaluando distintas propiedades como antibacterianas, antiinflamatorias antidiabéticas y antioxidantes (Ávila

et al., 2019a; Biluca et al., 2017, 2020). Sin embargo la producción y comercialización de la miel de abejas sin aguijón se ve disminuida por el abandono de la meliponicultura debido a la introducción de las abejas melíferas, así como a diversos factores ambientales, la falta de normalización y estandarización de la misma, y el desconocimiento científico acerca de sus demás propiedades curativas. Por lo que, el seguir investigando las propiedades medicinales de la miel de abejas sin aguijón contribuiría a la revalorización de este producto.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los parámetros fisicoquímicos, compuestos bioactivos y actividad antioxidante de extractos de miel de abejas sin aguijón (*Melipona beecheii*) frente a tres enzimas (ureasa, elastasa y β -glucuronidasa) como indicadores de los efectos gastroprotector, antiinflamatorio y hepatoprotector respectivamente mediante pruebas *in vitro*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Miel

Diversos autores han definido a la miel como una sustancia elaborada por las abejas a partir del néctar de las plantas, secreciones de estas o excreciones de algunos insectos chupadores de savia, las abejas transforman estos componentes en su estómago con ayuda de algunas sustancias específicas, la invertasa contribuye en el proceso de formación de ésta hidrolizando la sacarosa en sus dos monosacáridos glucosa y fructosa obteniendo así la miel, que posteriormente será depositada en celdas o compartimientos donde pasará por un proceso de maduración y deshidratación (Codex Alimentarius, 1981).

La miel es un producto natural que se caracteriza por ser una solución altamente concentrada de una mezcla compleja de diferentes azúcares, así como de otros constituyentes como péptidos, vitaminas, minerales, enzimas, ácidos orgánicos, ácidos fenólicos, flavonoides entre otros. Esta composición es bastante variable y depende principalmente de su origen floral, factores ambientales, estación del año, método de cosecha y almacenamiento así como de la especie de abeja, también se ha visto que todas estas variables pueden influir en su contenido de compuestos bioactivos y efectos biológicos de la miel (Aljadi & Kamaruddin, 2004; Bertoneclj et al., 2007)

2.1.1 Clasificación

Dentro de la literatura se clasifica a la miel por su origen floral en: **miel de flores:** elaborada a partir del néctar proveniente de flores; **miel de mielada:** elaborada a partir de secreciones de insectos generalmente del género *Rhynchota* los cuales perforan los tejidos vegetales, succionan la savia y luego la secretan nuevamente; **miel monofloral:** elaborada exclusivamente de un solo tipo de planta y de la cuál recibirá el nombre de la planta de procedencia y **miel multifloral:** elaborada de diferentes fuentes florales y donde ninguna es predominante dentro de su composición (Codex Alimentarius, 1981).

2.2 Abejas sin aguijón

Las abejas sin aguijón pertenecen a la familia *Apidae*, dividiéndose a su vez en dos géneros, *Meliponini* y *Trigona*, estas forman parte de una pequeña fracción de las más de 20,000 especies de abejas en el mundo. Estas abejas se caracterizan por ser más pequeñas y resistentes a enfermedades y condiciones climáticas extremas que afectan a su contra parte (*Apis mellifera*), presentan vellosidades en la parte superior del tórax y cabeza, además de no poseer un aguijón funcional por lo que reciben el nombre de “abejas sin aguijón”, siendo estos factores los que hacen más fácil su cría y manejo (Ortiz-Reyes et al., 2022). Habitan en zonas con climas tropicales y subtropicales, pudiéndose encontrar en países como Asia, África, Australia y América, en este último se extienden desde México hasta Brasil. Dentro del género *Melipona* se han reportado más de 500 especies distintas y descritas en 32 géneros (Nordin et al., 2018), de las cuales, el 26% de éstas son endémicas de México, habitando desde la región costa del pacífico, el golfo y sureste del país.

Al manejo de estas abejas se le conoce como “meliponicultura”, actividad que se ha llevado a cabo principalmente por diferentes etnias y comunidades indígenas desde tiempos muy antiguos, esta actividad les ha permitido criarlas y cultivarlas obteniendo principalmente miel y otros sub productos de la colmena como polen, cera y propóleo. La importancia de dicha práctica tiene una trascendencia multifactorial teniendo impactos económicos, culturales y principalmente ambientales. La meliponicultura forma parte de una de las principales actividades realizadas en su mayoría por mujeres, así como también se ha utilizado con fines medicinales y religiosos en diferentes prácticas dentro de estos grupos sociales, además, de que en las regiones donde habitan fungen como polinizadoras de una diversidad de plantas y cultivos a nivel mundial, de la misma manera en que forman simbiosis con plantas, artrópodos y bacterias manteniendo un equilibrio ecológico (Maia-Silva et al., 2020; Roubik, 2023)

2.2.1 Cultivo de abejas sin aguijón en México

La cría de abejas sin aguijón ha formado parte de la historia de México junto con el crecimiento de las grandes civilizaciones, con el pasar de los años esta práctica fue en decadencia debido a diferentes factores, uno de ellos como consecuencia de la introducción de abejas europeas, cuya producción de miel es mayor a comparación de las abejas nativas mexicanas, aproximadamente una colmena de Meliponas puede producir alrededor de 1 kg de miel por colmena al año, mientras que las abejas europeas de 15-20 kg, sin embargo aún perdura la relación intrínseca de estas abejas con la sociedad por su valor cultural, su rol en la economía local u por su importancia ambiental y ecológica (Baena-Díaz et al., 2023; Roubik, 2023), pero sobre todo, por sus propiedades medicinales.

Dada la importancia de dicha interacción es que se inició el manejo sistemático y controlado de diversas especies nativas (Meliponicultura) dentro del territorio mexicano, principalmente en los estados de Yucatán, Campeche, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz, Chiapas, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Nayarit y Oaxaca (Ayala et al., 2013; Sánchez-Tolentino et al., 2019).

La meliponicultura es una actividad económicamente viable que no requiere de grandes costos de implementación ni mantenimiento, además de que se ha vuelto una actividad en donde las mujeres pueden participar activamente gracias a que los meliponarios se instalan cerca de sus hogares (Fernandes et al., 2020; Márquez-Osuna, 2024). En México están reportadas alrededor de 46 tipos de abejas sin aguijón y dentro del estado de Veracruz se han reportado 24 de estas especies (Zepeda, 2022), entre los años 2019-2021 alrededor de 12,968 colmenas productoras fueron registradas en este mismo estado, siendo el municipio de Atzalan el que cuenta con la mayor cantidad de estas contando con cerca de 5,225 colmenas distribuidas entre 203 meliponicultoras pertenecientes al colectivo de mujeres el Gachupinate con una producción de 1,222 L por año, siendo las especies trabajadas *Melipona beecheii*, *Nannotrigona perilampoides*, *Scaptotrigona mexicana* y *Plebeia spp.* (Alvarez-Velazquez et al., 2024; SEMARNAT, 2022).

En los últimos años se ha incrementado la demanda de miel de abejas sin aguijón y otros de sus subproductos retomando el interés por la meliponicultura, debido a sus propiedades

medicinales, sin embargo esta actividad requiere de mayor investigación y difusión de información acerca de los posibles efectos sobre la salud existentes de este tipo de mieles.

2.2.2 Composición química de la miel de abejas sin aguijón

La miel de abejas sin aguijón posee cualidades únicas en comparación a la miel de *Apis mellifera*, como lo son textura fluida, cristalización lenta, mayor acidez, y una amplia variedad de colores, sabores y aromas. Siendo constituida por aproximadamente más de 200 compuestos diferentes (Abd Jalil et al., 2017). Los azúcares son el mayor constituyente de la miel (**Figura 1**), encontrándose en mayor concentración los monosacáridos glucosa y fructosa, los cuales representan aproximadamente el 85% de los sólidos totales, también se encuentran en cantidades menores sacarosa, maltosa, arabinosa, turanosa, erlosa, y trehalosa (Ngaini et al., 2023). Una de las características más notables es su elevado contenido de humedad, que viene determinada por el origen botánico del néctar, el clima y condiciones de cosecha. La miel madura de abejas sin aguijón normalmente presenta un contenido de humedad por encima del 18.5% (Biluca et al., 2016)., debido a esta característica la miel de abejas sin aguijón también tiene la peculiaridad de fermentar debido al crecimiento de levaduras asmo-fílicas, este proceso de fermentación va a ser en parte responsable de su aroma y sabor característico, el pH de la miel de abejas sin aguijón oscila entre 2.5-3.8, debido a la presencia de ácidos orgánicos como el ácido glucónico, acético y málico otorgándole mayor acidez (Nordin et al., 2018).

El contenido de proteínas en la miel es relativamente bajo (0.5%), conteniendo principalmente, fracciones de proteínas, algunos aminoácidos y enzimas. En la miel encontramos enzimas como la α -amilasa, la β -glucosidasa y la glucosa oxidasa que contribuyen a la transformación del néctar en miel, así como de los cambios que ocurren durante este proceso, dentro de los aminoácidos la prolina es el más abundante seguido por la lisina, el ácido glutámico y el ácido aspártico y en menores cantidades asparagina, serina, glicina, arginina, treonina, alanina, tirosina, valina leucina, isoleucina, fenilalanina y triptófano (Biluca et al., 2019). Dentro de su composición también se encuentran vitaminas y minerales como K, Na, Ca, Mg, Mn, P, Cu, Fe, Zn (Hungerford et al., 2020).

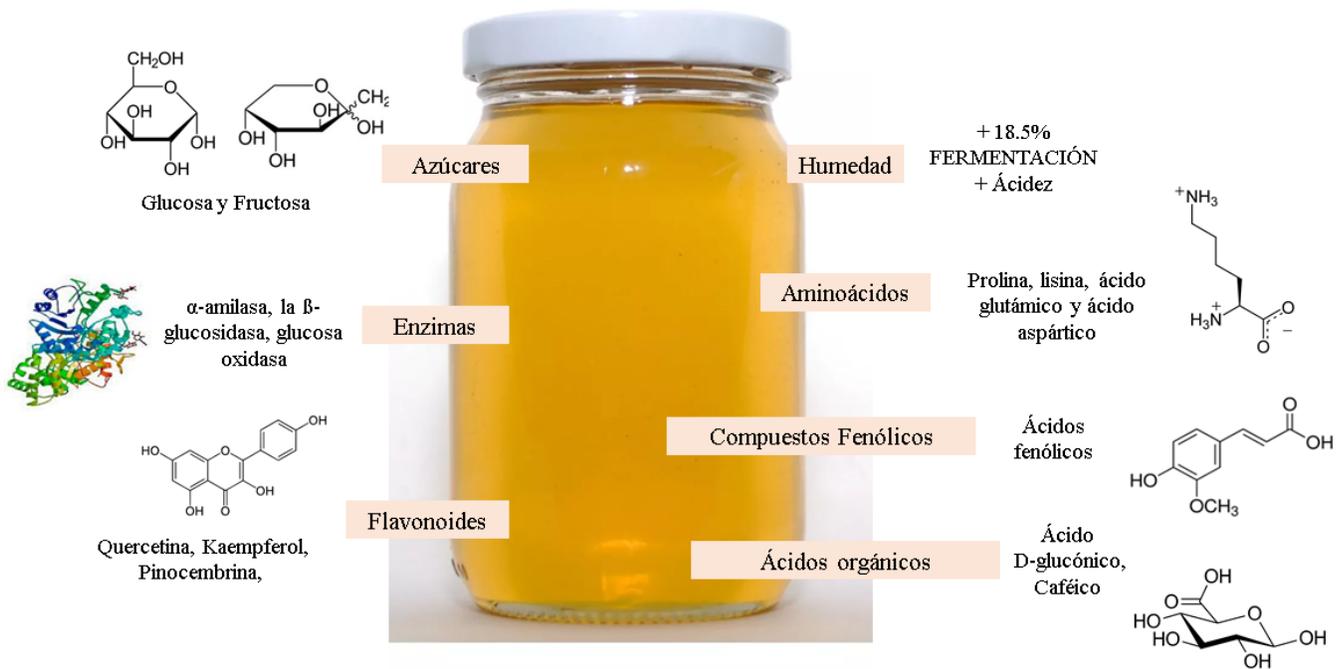


Figura 1 Composición química de miele de abejas sin aguijón

Fuente: Elaboración propia 2024

2.2.3 Compuestos bioactivos presentes en la miel de abejas sin aguijón

Los compuestos bioactivos son producto del metabolismo secundario de las plantas que utilizan como mecanismo de defensa ante el estrés abiótico y biótico, estos compuestos pueden ser clasificados en terpenoides, tioles y compuestos fenólicos, estos últimos se caracterizan por poseer un anillo aromático dentro de su estructura enlazados a uno o más grupos hidroxilo (-OH), la presencia y cantidad de estos grupos funcionales se relaciona a la actividad antioxidante de estos compuestos. Los compuestos fenólicos se pueden clasificar en distintas categorías dividiéndose en ácidos fenólicos, lignanos, estilbenos y flavonoides (Urrialde et al., 2022).

El contenido de compuestos bioactivos en las mieles depende principalmente del origen del néctar y polen que las abejas utilizan para su elaboración. De acuerdo con algunos estándares establecidos para la miel de abejas sin aguijón, los compuestos bioactivos representan un indicador importante para determinar la calidad de la miel, estudios han reportado la

presencia de al menos 14 compuestos fenólicos establecidos para la miel de abeja *Melipona beecheii* (**Tabla 1**), los compuestos mayormente presentes son el ácido benzoico, ácido fenilpropano, el ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido protocatecuico, leuteolina y ácido p-cumárico, la presencia de este último se ha relacionado directamente como indicador de buena calidad en la mie ([Ávila et al., 2019a](#); [Ngaini et al., 2023](#); [Ruiz-Ruiz et al., 2017](#)).

Tabla 1 Compuestos bioactivos presentes en la miel de abejas sin aguijón

Grupo	Compuesto
Ácidos fenólicos	Ácido cumárico, ácido benzoico, ácido vainílico, ácido cafeico, ácido transferúlico, ácido siríngico, ácido sináptico, ácido clorogénico, ácido rosmarínico, ácido gálico, ácido elágico, ácido cinámico, epigenin y sus isómeros, o
Flavonoides	Quercetina, narigenina, isorhamnetina, taxifolina, miricetina, catequina, rutina, kaempferol, hesperetina, crisina, pinocembrina
Terpenos, sesquiterpenos, diterpenos	α -felandreno, totarol, α -pineno, β -cariofileno, muuroleno, cadieno, α -cubebeno, α -amirina, β -amirina,
Ácidos orgánicos	Ácido glucónico, ácido gálico, ácido málico, ácido cítrico, ácido acético,

Fuente: Tomado de ([Ngaini et al., 2023](#); [Ramanauskiene et al., 2012](#); [Santos et al., 2021](#))

2.2.4 Efectos benéficos a la salud de la miel de abejas sin aguijón

La miel ha sido utilizada como terapia medicinal para tratar diversas enfermedades y lesiones, sus propiedades curativas se han visto relacionadas a su composición la cual está determinada por diversos factores como el origen floral, derivado de esto se ha informado que la miel podría actuar como un vehículo acarreado las propiedades medicinales de las plantas a su composición ([Santos et al., 2023](#)).

Como parte de la medicina tradicional la miel de abejas sin aguijón se ha utilizado para combatir infecciones respiratorias, en la cicatrización de heridas, curación de quemaduras, disminución de cataratas oculares, así como en el tratamiento de úlceras de diferente etiología incluidas las gástricas ([Alvarez-Suarez et al., 2014](#)), la razón por la cual la miel posee estos diversos efectos terapéuticos y medicinales es debido a sus propiedades antioxidantes, antibacterianas, antiinflamatorias e inmunoreguladoras, sin embargo la miel de abejas sin

aguijón también se ha utilizado para la investigación *in vitro* para evaluar propiedades como anticancerígenas, antimutagénicas, antidiabéticas, antihipertensivas (Ávila et al., 2019a; Costa dos Santos et al., 2021b; Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013; Ruiz-Ruiz et al., 2017; Santos et al., 2023).

2.2.5 Antecedentes acerca de la miel de abejas sin aguijón

La miel de abeja sin aguijón ha sido muy valorada y utilizada a lo largo del tiempo y actualmente se sigue utilizando debido a su composición nutricional pero sobre todo porque le han atribuido numerosas cualidades curativas y medicinales, sin embargo, no fue hasta hace algunos años que se empezaron a estudiar de manera científica la composición y propiedades funcionales de este tipo de mieles. Se ha encontrado que, de las investigaciones realizadas en torno a su caracterización fisicoquímica, se determinaron el contenido de humedad, azúcares totales y reductores, proteínas, acidez libre, pH, hidroximetil furfural, diastasa, color y cenizas (Biluca et al., 2017; Fernandes et al., 2020; Gomes et al., 2017; Villacrés-Granda et al., 2021), así como también el análisis de su origen botánico y como es que este influye en su composición y contenido de compuestos bioactivos (Álvarez-Suarez et al., 2018; Ávila et al., 2019) en cuanto a estos últimos, se han determinado el contenido de fenoles, flavonoides y carotenoides principalmente, (Braghini et al., 2019). Algunas otras propiedades ya reportadas y que van en relación con su contenido de compuestos bioactivos es su capacidad antioxidante, los análisis más frecuentes para determinar dicha actividad han sido ensayos de FRAP, DPPH, ABTS y ORAC (Abu Bakar et al., 2017; Majid et al., 2020; Sousa et al., 2016), inclusive se han realizado estudios comparativos en mieles de abejas sin aguijón donde se han reportado mayor cantidad de compuestos bioactivos y actividad antioxidante que en las mieles provenientes de *Apis mellifera* (Alvarez-Suarez et al., 2018; Nweze et al., 2017). A su vez, se ha probado la actividad antimicrobiana de distintas mieles de abejas sin aguijón sobre aproximadamente 60 especies bacterianas dentro de las cuales encontramos Gram positivas y Gram negativas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus alactolyticus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella pneumoniae aeruginosa*, *Salmonella choleraeuis parahemolyticus*, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas*

aeruginosa (Ávila et al., 2019b; Ramón-Sierra et al., 2020; Tuksitha et al., 2018), otros estudios evaluaron el efecto antimicrobiano de este tipo de mieles con la finalidad de utilizarlas en el tratamiento de heridas, úlceras y quemaduras, mostrando efectos positivos (Zamora & Arias, 2011).

En cuanto a la actividad biológica se ha evaluado el efecto prebiótico de este tipo de mieles hacia las cepas *Lactobacillus aciophilus* y *Bifidobacterium animalis* de manera *in vitro* (Melo, 2020). Otra de las actividades biológicas reportadas es su potencial antiinflamatorio y su uso en el tratamiento de algunas enfermedades causadas por inflamación como arterosclerosis, artritis y cáncer (Ruiz-Ruiz et al., 2017) de la misma manera se encontraron estudios acerca de la posible actividad antidiabética de la miel de abeja sin aguijón mediante la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa de manera *in vitro*. Sin embargo la mayoría de estas investigaciones provienen de Asia o Sudamérica y se ha reportado muy poco acerca de las mieles mexicanas (Ali et al., 2020).

2.3 Enfermedades gástricas

Se ha investigado en los últimos años la prevalencia de desarrollar algunas enfermedades de carácter gástrico en la población mexicana, las más frecuentes han sido gastritis, úlceras gastroduodenales, gastroenteritis y cáncer gástrico (Murillo-Zavala et al., 2023), dichas enfermedades afectan considerablemente la calidad de vida de los mexicanos debido a que su etiología se debe a múltiples factores principalmente relacionados con el estilo de vida como, el consumo de alimentos y sustancias irritantes, la automedicación con agentes alcalinos y la infección por *Helicobacter pylori*. Se estima que aproximadamente del 70.1 al 84.7% de la población mexicana está infectada por dicha bacteria (Hernández-Reyes et al., 2020).

Helicobacter pylori es una bacteria patógena, Gram negativa, flagelada, curva o espiralada, cuya característica más importante es la producción de ureasa **Figura 2**, debido a la acción de esta enzima es que puede colonizar la superficie del epitelio gástrico por medio de la transformación de la urea en amoníaco y dióxido de carbono, la presencia de amoníaco en el estómago eleva el pH gástrico y favorece su proliferación causando inflamación y daños en la mucosa y tejidos (Baltaş et al., 2017).

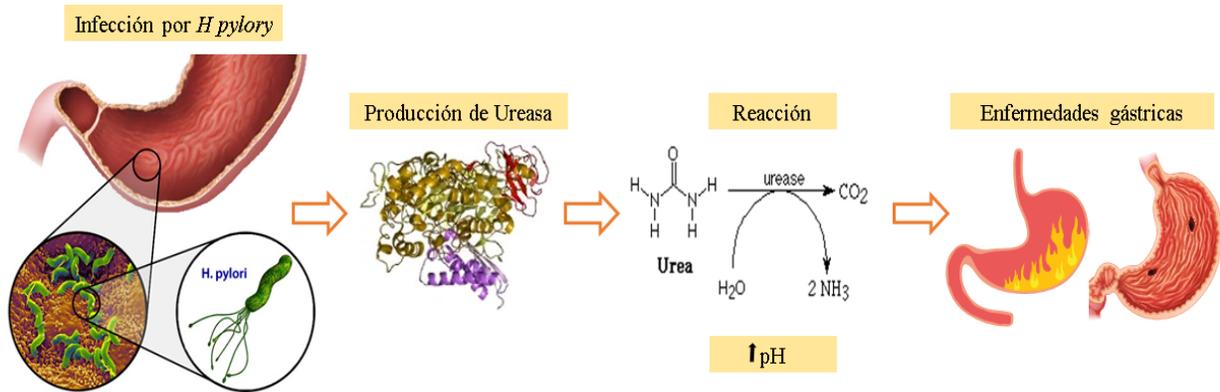


Figura 2 Producción de ureasa por *Helicobacter pylori* y su incidencia en el desarrollo de enfermedades gástricas

Fuente: Elaboración propia 2024

La infección por *Helicobacter pylori* se ha visto implicada en varios de los procesos inflamatorios relacionados con algunas enfermedades gástricas, por lo que es la responsable del 80% de los casos de úlceras gástricas, el 95% de úlceras duodenales, el 90% de los casos de gastritis crónica y del 90% de desarrollar carcinoma gástrico (Bosques-Padilla et al., 2018). Aún no están bien establecidos los factores de virulencia de esta bacteria debido a que existen una variedad de acontecimientos a los que se le puede estar relacionada, sin embargo se sugiere que la transmisión puede darse por contacto fecal-oral u oral-oral a través de agua y alimentos contaminados y condiciones de higiene deficientes (Meza-Junco & Montano-Loza, 2016; Ramírez Ramos et al., 2002).

Los malos hábitos alimenticios por parte de la población, su fácil infección y colonización en el estómago, aunado a que su detección temprana es complicada por ser de carácter asintomática, conlleva a que se busquen alternativas para poder erradicar o prevenir su infección. Se han utilizado distintas pruebas para identificar su presencia **Diagrama 1**, sin embargo aún no se ha establecido un método de detección óptimo teniendo que utilizar en ocasiones dos de estas pruebas (Chahuan et al., 2022).

Los tratamientos establecidos hasta ahora para combatir la infección por *Helicobacter pylori* se centran en la combinación de distintos antibióticos (claritromicina y la amoxicilina) con

inhibidores de la bomba de protones (omeprazol, pantoprazol, metronidazol) sin embargo este tipo de tratamiento puede traer consigo problemas como la resistencia antimicrobiana y fallas en el tratamiento (Icaza-Chávez et al., 2020).

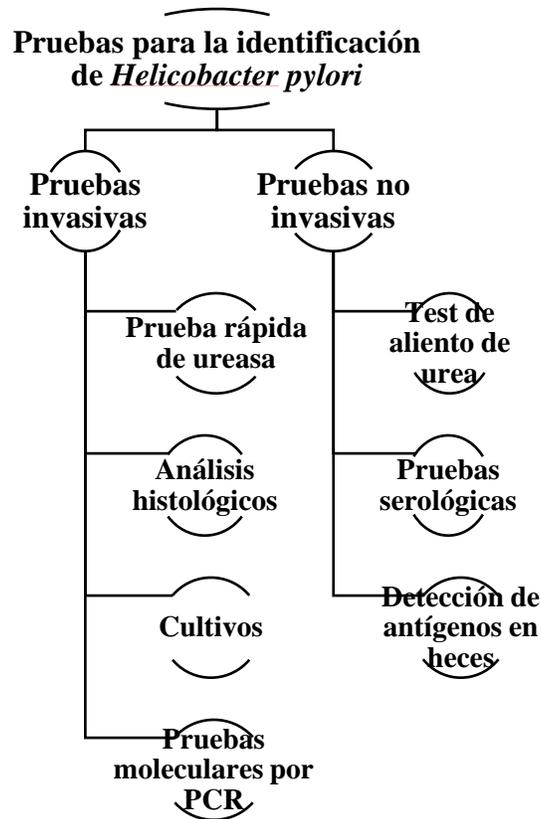


Diagrama 1 Pruebas más utilizadas para la identificación de *Helicobacter pylori* en humanos

Fuente: Adaptado de (Chahuan et al., 2022)

2.4 Enfermedades inflamatorias

La inflamación es un proceso de respuesta y defensa ante cualquier cambio drástico o afección en las células y tejidos del cuerpo actuando como un mecanismo homeostático para adaptar al organismo ante éstas situaciones. Este proceso se puede presentar por lesiones, traumatismos, infecciones, reacciones tóxicas autoinmunes entre otras (Ahmed, 2011).

La respuesta inflamatoria del cuerpo generalmente es breve y específica en la zona del daño, sin embargo si la inflamación es constante y por periodos largos de tiempo se denomina

inflamación crónica. La clasificación de la inflamación (**Diagrama 2**) depende de distintos factores tales como su duración, carácter, características morfológicas y localización (Villalba Herrera, 2014).

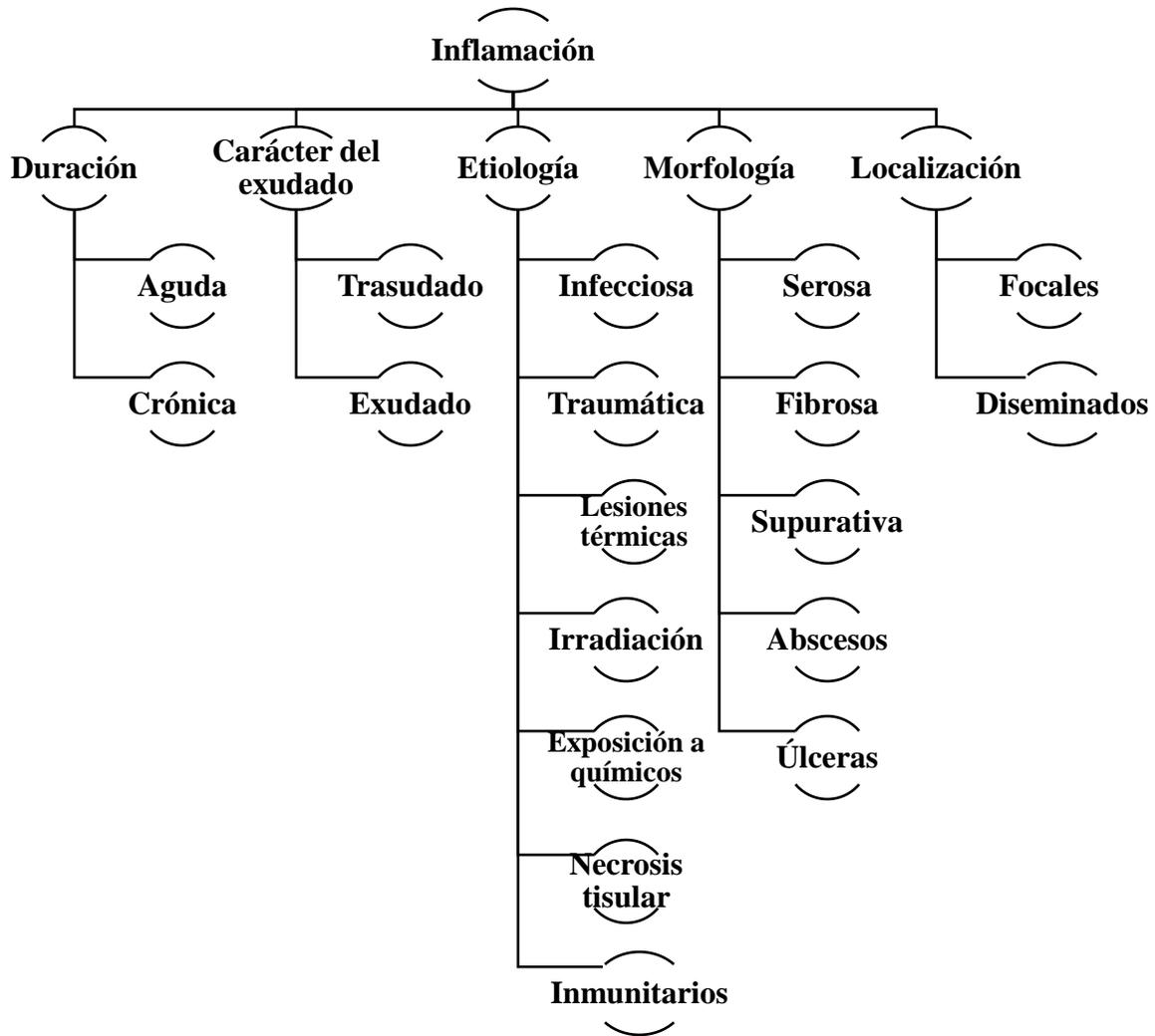


Diagrama 2 Clasificación de la inflamación

Fuente: Adaptado de (Villalba Herrera, 2014)

Estudios sugieren que la inflamación desregulada promueve el desarrollo de cáncer, relacionando con cerca del 25% de los casos de neoplasia maligna con algún tipo de inflamación crónica (Multhoff et al., 2012). Dentro de los posibles mecanismos por los cuales se desencadena el proceso inflamatorio se ven implicados los mediadores pro inflamatorios y tumorigénicos, donde participan citocinas, quimiocinas, enzimas y células inmunitarias (Chai et al., 2015). Los neutrófilos son un tipo de glóbulos blancos muy abundantes en la

sangre, estos participan activamente durante los procesos inflamatorios ya que modulan su actividad por medio de la secreción de sustancias dentro de ellos reduciendo o promoviendo la respuesta inflamatoria (Keitelman, 2019), así mismo algunos estudios han relacionado la actividad desmedida de los neutrófilos con el desarrollo de enfermedades producidas por inflamación, ya que producen especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a que los desórdenes inflamatorios provocan fallas en la eliminación de células apoptóticas y también son una fuente de producción de otras sustancias como citoquinas pro inflamatorias y enzimas que pueden dañar los tejidos como la elastasa de neutrófilos o la catepsina-G (Silva O et al., 2015; Soehniein et al., 2017).

Si bien la inflamación se crea como una medida de defensa del organismo también tiene influencia sobre la generación de diversas enfermedades como cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos (Alzheimer), obesidad, diabetes, asma, artritis reumatoide, inflamaciones gastrointestinales (úlceras, colitis), enfermedades renales, esclerosis múltiple y cáncer, sin embargo los alimentos naturales y la dieta en general juega un papel importante para la regulación de la inflamación crónica por medio de la ingesta de nutrientes y compuestos biológicamente activos que podrían contribuir a remediar dicho proceso (Asús et al., 2019).

2.5 Enfermedades hepáticas

El hígado es el órgano encargado de la metabolización de carbohidratos, lípidos y proteínas dentro del cuerpo pero también se encarga de la biotransformación de ciertas sustancias y agentes químicos como fármacos y xenobióticos, debido a esta labor es susceptible a desarrollar toxicidad hepática (García-Cortés et al., 2005), las reacciones adversas que sufre el cuerpo a causa de la absorción de estas toxinas suele ser idiosincrática, por lo que es difícil detectar una intoxicación de este tipo en etapas tempranas, lo que significa que en aquellas personas que reciben medicación con dosis crónicas de distintos compuestos químicos y fármacos podrían generar metabolitos tóxicos, provocando su acumulación en el hígado (Paniagua et al., 2017).

Algunas de las hepatotoxinas generadas afectan directamente a los hepatocitos y otras por medio de la formación de compuestos tóxicos producidos durante el metabolismo de dicha

sustancia, la finalidad del proceso de biotransformación es la eliminación de productos tóxicos dentro del organismo mandándolas a los riñones o al sistema biliar (Moreno Otero, 2002), sin embargo en ocasiones los productos considerados no tóxicos para el hígado pueden convertirse en compuestos hepatotóxicos provocando lesiones en el órgano que con el tiempo producen enfermedades hepáticas como el hígado graso no alcohólico, cirrosis o carcinoma hepático (Tejada Cifuentes, 2010).

Las reacciones de biotransformación (**Figura 3**) en el organismo pueden clasificarse en **reacciones de tipo I:** donde se introduce un tipo de grupo funcional (OH, NH₂, SH) convirtiendo el compuesto original en moléculas más polares para su posterior eliminación y **reacciones de tipo II:** en donde si los compuestos formados no se excretan el grupo funcional se une a un sustrato como el ácido glucurónico, sulfúrico, glicina o glutatión para formar conjugados, en donde posteriormente serán excretados en la bilis u orina o se transportarán del hígado a otros tejidos (Encinas Sotillos et al., 2017). La fase II es importante para evitar la toxicidad de los metabolitos generados en la biotransformación enzimática de la fase I, pero en ocasiones los productos conjugados en la fase II suelen ser más tóxicos que el propio producto original por lo que la reabsorción de estos compuestos conjugados en el hígado en lugar de su eliminación lleva a desarrollar toxicidad (Ayyadurai et al., 2023).

Los medicamentos como los antibióticos, antiinflamatorios no esteroideos, anti convulsionantes y antineoplásicos parecieran ser los responsables de producir reacciones hepatotóxicas en el hígado, no obstante, el riesgo exacto de hepatotoxicidad por fármacos sigue en investigación, pero al mismo tiempo siguen incrementando los casos de hepatotoxicidad crónica entre la población, la ausencia de medios de identificación precisos y tratamientos terapéuticos adecuados para prevenir la hepatotoxicidad de diferentes sustancias abre camino hacia nuevas investigaciones enfocadas en evitar la reabsorción de compuestos en el hígado (Rios Choque, 2023) .

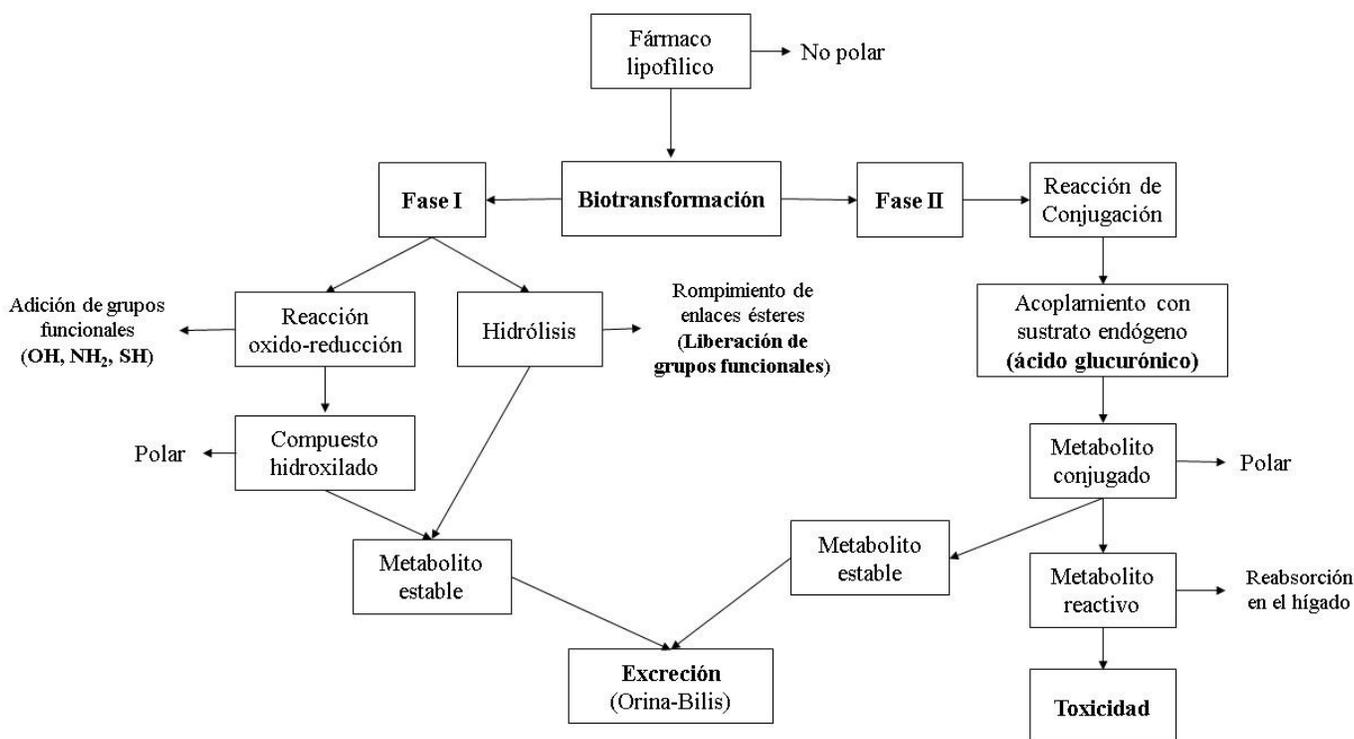


Figura 3 Metabolismo de fármacos en el hígado

Fuente: Elaboración propia 2024

2.6 Enzimas implicadas en enfermedad

Las enzimas funcionan como biomarcadores y se evalúan para determinar si su presencia en el cuerpo es signo de un proceso normal o anormal proporcionando un diagnóstico médico o un indicio de enfermedad, sin embargo al ser estructuras que producen cambios bioquímicos específicos dentro del organismo pueden causar en algunos casos problemas ocasionando o influyendo en el desarrollo de ciertas enfermedades (Guevara Tirado, 2024).

2.6.1 Ureasa

La ureasa es una enzima producida y utilizada por múltiples organismos, desde plantas, hongos, algas y bacterias. Esta es una metaloenzima de múltiples subunidades que se caracteriza por contener iones níquel (Ni^+) en su estructura, ésta cataliza la hidrólisis de urea en carbamato y amoniaco (Aktaş Karaçelik & Sahin, 2018). En el caso de las bacterias ureolíticas como *Helicobacter pylori*, la urea generada en grandes cantidades por el hígado

es secretada en los intestinos proporcionándole un suministro de nitrógeno para su supervivencia dentro del cuerpo, la reacción que se lleva a cabo por la colonización de *Helicobacter pylori* dentro del estómago da como resultado un aumento de pH en el entorno, alterando la funcionalidad de este y dañando la mucosa gástrica, produciendo gastritis, úlceras gástricas, doudenales y cáncer gástrico (Kumar et al., 2021), debido a esto junto con la gran prevalencia de infección por dicha bacteria en la población es que se están buscando alternativas para contrarrestar dicho problema, sin embargo los tratamientos propuestos no han sido los mejores debido al desarrollo de resistencia antimicrobiana, por lo que se está implementando el uso de inhibidores inorgánicos de la ureasa, demostrando que el ácido hidroxámico y sus derivados (Al-Rooqi et al., 2023) prometer ser inhibidores viables y de unión lenta con la ureasa vegetal y microbiana, desafortunadamente estos inhibidores presentan una gran cantidad de efectos adversos para la salud, por lo que actualmente se buscan inhibidores de la ureasa provenientes de en fuentes naturales como extractos herbales o alimentos que proporcionen dicha inhibición y con ello tratar las enfermedades causadas por bacterias productoras de ureasa como *Helicobacter pylori* (Kafarski & Talma, 2018)

2.6.2 Elastasa

La elastasa es una enzima perteneciente a la familia de las serina proteasas que degrada algunos componentes biológicos como la elastina, el colágeno, proteoglicanos, fibronectina y componentes de la matriz extracelular, esta se encuentra e los lisosomas de algunas células incluidos los leucocitos macrófagos y neutrófilos humanos (Döring, 1994), su liberación por estas células en el organismo puede deberse a diversos factores como la infección por virus y bacterias, reacciones inmunitarias, y otros múltiples estímulos y lesiones físicas como heridas y traumatismos, se ha probado que la sobreactividad de esta enzima (cuando existe un desequilibrio entre la elastasa y si inhibidor la antitripsina) en el cuerpo provoca lesiones en diferentes tejidos y órganos. Durante el proceso de inflamación los neutrófilos son atraídos al tejido dañado por medio de las sustancias quimoatrayentes que permiten su adherencia y posterior salida del endotelio liberando elastasa, fosfolipasas y colagenasas, la liberación de estas enzimas se ha visto implicada en varios procesos inflamatorios cónicos (**Figura 4**) y en procesos de muerte celular, formación de citoquinas proinflamatorias y quimosinas (Salvador et al., 2013). Los tratamientos para estas enfermedades provocadas por inflamación se

centran únicamente en disminuir el dolor y los síntomas, sin embargo la inflamación persiste, ocasionando que haya una constante segregación de elastasa por parte de los neutrófilos y macrófagos. Actualmente se han desarrollado fármacos para inhibir la elastasa y disminuir su actividad durante el proceso de inflamación sin mucho éxito debido a la superposición de esta enzima con las de otras serina proteasas, aunado al hecho de que traen consigo diversos efectos secundarios que podrían afectar aún más dichas enfermedades, ocasionando que el desarrollo de fármacos sintéticos sea complicado, de ahí la importancia de recurrir a otras medidas para tratar de inhibir la actividad de la elastasa en el tratamiento de enfermedades degenerativas inflamatorias (Narayanaswamy et al., 2015).

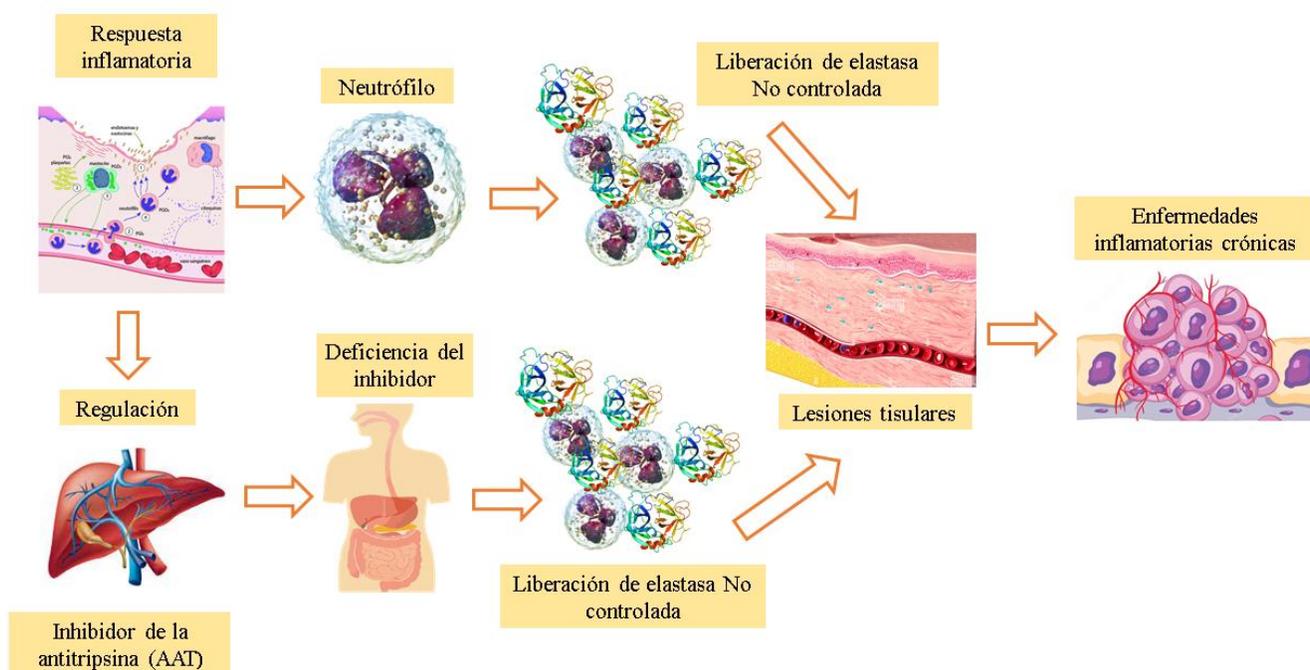


Figura 4 Efecto de la elastasa sobre el desarrollo de inflamación crónica.

Fuente: Elaboración propia 2024

2.6.3 β -Glucuronidasa

La β -glucuronidasa pertenece a la familia de las hidrolasas lisosomales, participa en el metabolismo y biotransformación de metabolitos, sustancias químicas y fármacos dentro del hígado, siendo clave para la detoxificación del organismo (Sekikawa et al., 2002). Esta enzima es responsable del proceso de glucuronidación donde convierte los metabolitos y sustancias

químicas en compuestos más polares a través de la hidrólisis del ácido glucurónico y su posterior conjugación con el metabolito para después ser excretados, sin embargo algunos de estos compuestos también llamados glucuronidos, no se liberan (Oleson & Court, 2008). Este proceso de glucuronidación forma parte importante de la Fase II del metabolismo de las toxinas en el hígado, y la reacción opuesta a este proceso es la desglucuronidación, en la cual los glucuronidos formados anteriormente se reabsorben en el hígado en lugar de excretarse dando como resultado toxicidad hepática, la desglucuronidación es catalizada por la enzima β -glucuronidasa la cual se encuentra presente en diversos órganos y tejidos como el hígado, el bazo, el epitelio gastrointestinal, y órganos endócrinos. La actividad incrementada de la β -glucuronidasa promueve la desconjugación de glucuronidos formando consigo bilirrubinato de calcio en el hígado lo que a su vez junto con la reabsorción de toxinas incrementa el daño hepático (Figura 5) (Liew et al., 2020). Por lo cual la inhibición de la enzima β -glucuronidasa en el hígado podría servir como un mecanismo hepatoprotector previniendo el daño hepático por toxicidad.

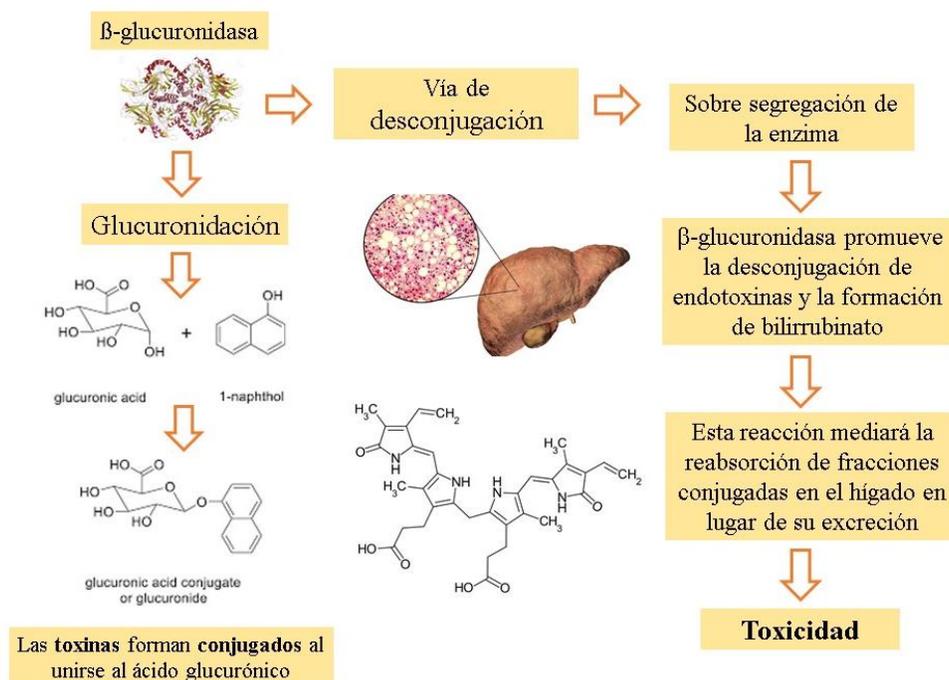


Figura 5 Implicación de la β -glucuronidasa en la toxicidad hepática

Fuente: Elaboración propia 2024

3 JUSTIFICACIÓN

La prevalencia de enfermedades crónicas representa una constante amenaza para la salud, representando 41 millones de muertes a nivel mundial; lo que las sitúa como la principal causa de muerte y discapacidad en el mundo, lo que equivale al 71% de los fallecimientos que se producen debido a su etiología multifactorial (INSP, 2021), así mismo se ha visto un incremento en el desarrollo de otras enfermedades como las gástricas, hepáticas e inflamatorias, las cuales se caracterizan por ser difíciles de detectar en etapas tempranas. Los tratamientos existentes se centran en el consumo de diversos fármacos como antibióticos, antiácidos, antiinflamatorios no esteroideos y algunos inhibidores enzimáticos sintéticos, sin embargo estos tratamientos traen consigo efectos secundarios nocivos para la salud.

Las abejas sin aguijón producen una miel muy valiosa con características únicas y abundantes propiedades medicinales, por lo que ha despertado gran interés desde el punto de vista medicinal, farmacológico y alimenticio aumentando considerablemente su demanda en países del oriente medio, así mismo representa una actividad en continuo crecimiento en algunos estados de México, donde antiguamente ya se le reconocían dichos beneficios a la salud. A pesar de esto, la mayoría de las investigaciones realizadas en torno a este tipo de mieles provienen de Asia y hay poca investigación acerca de mieles mexicanas.

Por lo anterior es que se deben de investigar más a fondo las propiedades medicinales de las mieles de abejas sin aguijón mexicanas y con ello crear un respaldo científico que contribuya a la revalorización de la meliponicultura del país.

4 HIPÓTESIS

La miel proveniente de abejas sin aguijón podría tener efecto inhibitorio relacionado a su composición fisicoquímica y compuestos bioactivos sobre las enzimas ureasa, elastasa y β -glucuronidasa como indicadores del efecto gastroprotector, antiinflamatorio y hepatoprotector respectivamente.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar los parámetros fisicoquímicos, contenido de compuestos bioactivos (fenoles, flavonoides) y actividad antioxidante de extractos de miel de abejas sin aguijón (*Melipona beecheii*) para determinar el efecto antiinflamatorio, gastroprotector, y hepatoprotector por medio de ensayos *in vitro*.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar los parámetros de humedad, pH, acidez libre, conductividad eléctrica, °Brix, índice de refracción y color, por medio de distintos métodos analíticos como parte de la caracterización de las mieles
- Determinar el contenido de fenoles y flavonoides totales de cada extracto mediante el método de Folin-Ciocalteu y el método de Tricloruro de aluminio.
- Determinar la capacidad antioxidante de los extractos provenientes de miel de abejas sin aguijón (*Melipona beecheii*) mediante la inhibición de los radicales libres ABTS y DPPH.
- Determinar la capacidad gastroprotectora, hepatoprotectora y antiinflamatoria de cada extracto mediante pruebas *in vitro*.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de la muestra

Se utilizaron cinco mieles en este estudio, las cuales fueron proporcionadas por el Sistema de Producción de Abejas Nativas del estado de Veracruz, México, cuya información de codificación georreferencia, municipio de procedencia, tipo y fecha de cosecha se muestran en la **Tabla 2**. Posteriormente, las mieles fueron trasladadas al laboratorio de Aprovechamiento Agroalimentario Integral del Instituto de Ciencias Agropecuarias, y fueron almacenadas en condiciones de oscuridad y a temperatura de 4° C hasta su posterior utilización.

Tabla 2 Información de las mieles de abejas sin aguijón del estado de Veracruz, utilizadas en este estudio

Muestra	Georreferencia	Edo, municipio y localidad	Tipo de miel	Fecha de cosecha
M26	19.4600 N, -93.855278 O	La Estanzuela, Emiliano Zapata, Veracruz	Multiflora	Mayo, 2022
M16	19.87632 N, -97.134454 O	El Progreso, Atzalan, Veracruz	Multiflora	Octubre, 2022
M19	19.9228 N, -96.99887 O	San Isidro, Atzalan, Veracruz	Multiflora	Septiembre, 2022
M23	19.88151 N, -97.140361 O	Tepantepec, Atzalan, Veracruz	Multiflora	Marzo, 2022
M29	19.39372 N, -96.91977 O	Teocelo, Teocelo, Veracruz	Multiflora	Enero, 2023

6.2 Preparación de extractos

La obtención de los extractos se realizó siguiendo la metodología establecida por Peláez-Acero et al. (2021), con algunas modificaciones. Se pesaron 3 g de miel en tubos de plástico con tapa y se les añadió agua estéril en proporción 1:10, se homogeneizaron durante 2 min y posteriormente se colocaron en un baño ultrasónico (Branson, 3510R-DTH, Estados Unidos) durante 20 min a 20°C (40kHz). Una vez sonicadas, las muestras se centrifugaron a 6000 fuerzas g, durante 15 min a 4°C en una centrífuga (HERMLE, Z36 HK, Alemania),

finalmente se recuperó el sobrenadante y se almacenó en condiciones de oscuridad a temperatura de 4°C hasta su posterior análisis.

6.3 Caracterización fisicoquímica

6.3.1 Humedad

El contenido de humedad de las muestras de miel se determinó por refractometría, en donde se colocó una gota de miel en el plato muestra del refractómetro digital (ATAGO, modelo MASTER-100H, Bellevue, WA, USA). para después cubrirlas y registrar las lecturas correspondientes. Los resultados se calcularon como $100 - \text{°Brix} = \text{contenido de humedad}$ (en un rango de 0-85% Brix) (Chuttong et al., 2016).

6.3.2 pH

Para determinar los valores de pH de las muestras de miel se siguió la metodología descrita por Gela et al (2021), se pesaron 5 g de cada una de las muestras de miel y se disolvieron en 35 mL de agua destilada y se homogeneizaron, después se introdujo el electrodo del potenciómetro HI 98130 (Hanna Instruments) previamente calibrado en las soluciones de miel y se esperó hasta tener las lecturas de pH.

6.3.3 Acidez libre

En cuanto a la acidez libre se utilizó la misma metodología previamente descrita por Gela et al (2021), las soluciones de miel se valoraron con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M hasta alcanzar una lectura constante de $\text{pH}=8.3$ después del inicio de la valoración, tomando como lectura los mL de hidróxido gastados. La acidez de la miel se expresó en miliequivalentes de ácido por kg de muestra de miel (meq/kg).

6.3.4 Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica se midió por medio del uso de un conductímetro (Basico Crison 30), para ello se prepararon soluciones de las muestras de miel al 20% (p/v), una vez calibrado el equipo la celda de conductancia se suspendió en las soluciones de miel previamente preparadas y se prosiguió a tomar las lecturas correspondientes expresándose en ($\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$) (Chuttong et al., 2016).

6.3.5 ° Brix

Los sólidos solubles totales de las muestras de miel se determinaron por refractometría, en donde se colocó una gota de miel en el plato muestra del refractómetro digital (ATAGO, modelo MASTER-100H, Bellevue, WA, USA), para después cubrirlas y registrar las lecturas correspondientes. Los resultados se expresaron en ° Brix = % de sólidos solubles/100 gramos de miel (Chuttong et al., 2016).

6.3.6 Índice de refracción

Para la medición del índice de refracción de las muestras de miel se utilizó un refractómetro digital (ATAGO, modelo MASTER-100H, Bellevue, WA, USA)., colocando una gota de miel líquida y perfectamente homogeneizada directamente sobre el prisma del aparato, la medición se llevó a cabo a una temperatura de 25° C aproximadamente de acuerdo con lo establecido por Gela et al (2021)

6.3.7 Color

La determinación del color en las muestras de miel se realizó por medio de una técnica espectrofotométrica de acuerdo con Quintero-Lira et al. (2019), el cuál consistió en preparar soluciones de miel y agua al 50% (p/v) y medir la absorbancia 635 nm en un espectrofotómetro (Jenway, Modelo 6715 UV/Vis, Reino Unido) las lecturas obtenidas se clasificaron de acuerdo con la escala de Pfund (**Tabla 3**).

Tabla 3 Clasificación del color de las mieles de acuerdo con la escala de Pfund

Absorbancia (nm)	Escala de Pfund (mm)	Color de la Miel
0.140-0.125	<8	Blanco agua
0.125-0.148	9-17	Extra blanco
0.148-0.195	18-34	Blanco
0.195-0.238	35-50	Extra ámbar claro
0.238-0.333	51-85	Ámbar claro
0.333-0.411	86-114	Ámbar
>0.411	>114	Ámbar Oscuro

6.4 Determinación de compuestos bioactivos

6.4.1 Fenoles Totales

El contenido de Fenoles totales en las mieles fue determinada siguiendo el método de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton et al. (1999), con algunas modificaciones. Se preparó el reactivo de Folin-Ciocalteu (F9252 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) en una concentración de 0.2N y carbonato de sodio (Na_2CO_3 , 17903 Fermont, Monterrey, NL, México) al 7.5%. Se tomaron 0.5 mL de cada uno de los extractos y se mezclaron con 2.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, cada ensayo se hizo por triplicado y se dejó reposar en oscuridad durante 10 min. Posteriormente se agregaron 2 mL de carbonato de sodio y se dejó reaccionar durante 2 h en oscuridad. Finalmente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Jenway, Modelo 6715 UV/Vis, Reino Unido) a 760 nm usando como blanco agua destilada.

Los resultados se interpretaron haciendo uso de una curva de calibración de 0-160 $\mu\text{m}/\text{mL}$ utilizando ácido gálico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$, 03251 Fermont, Monterrey, NL, México) como estándar de referencia. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico/100 g de muestra (mg EAG/100 g de muestra).

6.4.2 Flavonoides Totales

El contenido de Flavonoides totales en las mieles se determinó haciendo uso del método descrito por Quintero-Lira et al. (2019) , con algunas modificaciones. Se preparó tricloruro de aluminio (AlCl_3 , 0455 Meyer, Tláhuac, CDMX, México) a un 2% de concentración en metanol puro. Se tomaron 1 mL de cada extracto y se les añadió 1 mL de la solución de tricloruro de aluminio, cada ensayo se realizó por triplicado y se dejó reaccionar durante 20 min en oscuridad. Posteriormente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Jenway, Modelo 6715 UV/Vis, Reino Unido) a 415 nm usando como blanco metanol puro.

Los resultados se interpretaron haciendo uso de una curva de calibración de 0-40 $\mu\text{g/mL}$ utilizando quercetina (Q4951 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) como estándar de referencia. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de quercetina/100 g de muestra (mg EQ/100 g de muestra).

6.5 Determinación de la Capacidad Antioxidante

6.5.1 Inhibición del radical DPPH•

La inhibición del radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) se determinó siguiendo la metodología descrita por Pimentel-González et al. (2016) con algunas modificaciones. Primero se realizó la preparación del reactivo DPPH a una concentración de 0.2 Mm, para ello se pesaron 7.9 mg de radical DPPH• (D9132 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) y se disolvieron en 100 mL de metanol al 80%, esta disolución se dejó en agitación durante 2 horas en oscuridad, una vez transcurrido el tiempo se estandarizó ajustando la absorbancia a 0.7 ± 0.01 a 515 nm en un espectrofotómetro (Jenway, Modelo 6715 UV/Vis, Reino Unido) utilizando metanol al 80% como blanco.

Después se tomaron 500 μL de cada extracto y se les añadieron 2.5 mL de radical DPPH estandarizado anteriormente, este procedimiento se realizó por triplicado y se dejaron reaccionar durante 30 min en oscuridad. Finalmente se midió la absorbancia a 515 nm.

Los resultados se interpretaron haciendo uso de una curva de calibración de 0-30 $\mu\text{g/mL}$ utilizando (\pm) Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox, 238813

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) como estándar de referencia y los resultados se expresaron en mg equivalentes de Trolox/100 g de muestra (mg ET/100 g de muestra).

6.5.2 Inhibición del radical ABTS•+

La inhibición de radical ABTS•+ [ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Pimentel-González et al. (2016) con algunas modificaciones. Primero se prepararon 10 mL de ABTS•+ (A1888 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) a una concentración de 7 mM en agua destilada, después se agregaron 10 mL de persulfato de potasio (K₂S₂O₈, 55842 FERMONT, Monterrey, NL, México) 2.5 mM y se dejó reaccionar en agitación constante durante 16 horas en oscuridad, una vez transcurrido el tiempo se estandarizó ajustando la absorbancia a 0.7 ± 0.01 a 734 nm en un espectrofotómetro (Jenway, Modelo 6715 UV/Vis, Reino Unido) utilizando como blanco etanol al 20 %. Posteriormente se tomaron 100 µL de cada extracto y se les añadieron 3 mL de radical estandarizado anteriormente, cada ensayo se realizó por triplicado y se dejaron en reposo durante 2 h en oscuridad. Finalmente se midió la absorbancia a 734 nm en el espectrofotómetro.

Los resultados se interpretaron haciendo uso de una curva de calibración de 0 - 60 µg/mL utilizando Trolox (238813 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) como estándar de referencia y los resultados se expresaron en mg equivalentes de Trolox/100 g de muestra (mg ET/100 g de muestra).

6.6 Evaluación de la inhibición enzimática de los extractos

6.6.1 Inhibición de la enzima ureasa como indicadora del efecto gastroprotector de los extractos de miel

La evaluación del porcentaje de inhibición de la enzima ureasa se realizó siguiendo el método de Tanaka et al. (2004), con algunas modificaciones. Primero se preparó una solución madre de sustrato que contenía urea 150 mM, tampón fosfato 100 mM a pH 6.8, y rojo fenol al 0.002%. Se utilizó la enzima ureasa de *Canavalia ensiformis* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,

Estados Unidos) y esta se preparó a una concentración de 4U en tampón fosfato a pH 6.8. Para el ensayo de inhibición se mezclaron en tubos de 5 mL, series de 50-500 µL de cada extracto y 100 µL de ureasa, estos se preincubaron en un baño con agitador horizontal (Scorpion Scientific, CDMX, México) durante 10 min a 37 °C, posteriormente se agregaron 500 µL del sustrato previamente preparado y tampón fosfato y se dejaron incubar durante 30 min. Se observó el cambio de coloración de la solución de levemente amarillo a rosado intenso, pasado este tiempo se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro (Jenway, Modelo 6715 UV/Vis, Reino Unido) y se realizaron los cálculos del porcentaje de inhibición de la enzima mediante la Fórmula 1.

Fórmula 1. Porcentaje de Inhibición enzimática

$$\%Inhibición = \left[\frac{Abs\ Control - Abs\ Muestra}{Abs\ Control} \right] \times 100$$

6.6.2 Inhibición de la enzima elastasa como indicadora del efecto antiinflamatorio de los extractos de miel

La evaluación del porcentaje de inhibición de la enzima elastasa se realizó de acuerdo con la técnica espectrofotométrica de la elastasa pancreática porcina de acuerdo al método modificado de Lee et al. (1999) cada ensayo de inhibición se hizo por triplicado. Para ello se utilizó N-succinil-(Ala) 3-p-nitroanilina (PPE tipo IV, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) como sustrato en una concentración de 1.015 M, esta se disolvió en Tris-HCl (PHG0002 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) en concentración de 0.1 M a pH 8. Después se disolvieron 0.01 mg/mL de elastasa (E1250 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) con buffer Tris-HCl 0.2 M (pH 8). Posteriormente se llevó a cabo la reacción utilizando tubos de 5 mL, a éstos se les agregó series de 50-500 µL de cada extracto, 100 µL de elastasa, 100 µL del sustrato previamente preparado y 150 µL de Tris-HCl 0.2 M (pH 8), estos se incubaron en un baño con agitador horizontal (Scorpion Scientific, CDMX, México) por 40 min. Se observó el cambio de coloración de la solución de levemente amarillo a amarillo intenso. Finalmente se midió la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro (Jenway, Modelo 6715 UV/Vis, Reino Unido) y se realizaron los cálculos correspondientes mediante la Fórmula 1.

6.6.3 Inhibición de la enzima β -glucuronidasa como indicadora del efecto hepatoprotector de los extractos de miel

La evaluación del porcentaje de inhibición de la enzima β -glucuronidasa se realizó utilizando la técnica descrita por Karak et al. (2017), con algunas modificaciones. En tubos de 5 mL se colocaron series de 50-500 μ L de extracto y se les añadieron 200 μ L de solución de β -glucuronidasa (G7396 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos). Posteriormente se pre incubaron a 37 °C durante 15 minutos en un baño con agitador horizontal (Scorpion Scientific, CDMX, México). Luego de la preincubación se agregaron 120 μ L de 4-nitrofenil- β -D-glucurónido (N1627 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) como sustrato y se dejaron en incubación durante 50 min a 37 °C, se utilizó ácido sacárido 1,4 lactona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) como control. Se observó el cambio de color de la solución de incoloro a amarillo Finalmente se realizaron los cálculos correspondientes mediante la Fórmula 1

6.7 Análisis Estadísticos

Se llevó a cabo un diseño experimental totalmente al azar, los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados fueron analizados bajo un análisis de varianza ANOVA de una sola vía, con un nivel de significancia de ($p \leq 0.05$) entre las muestras junto con una prueba de comparación de medias de Tukey y una Correlación de Pearson.

Se empleó el software IBM SPSS Statics para realizar las pruebas estadísticas correspondientes y los gráficos se hicieron en el software SigmaPlot.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización fisicoquímica

Las mieles de abejas sin aguijón presentan valores diferentes a los establecidos para la composición fisicoquímica proveniente de *Apis mellífera*, sin embargo aún no se han establecido valores propios para estas mieles dentro de la normatividad mexicana por lo que suelen ser comparados con los valores establecidos por la Comisión Internacional de la Miel (IHC). El estudio de los parámetros fisicoquímicos de las mieles de abejas sin aguijón evaluadas en este estudio comprendieron humedad, pH, acidez libre, conductividad eléctrica, °Brix, índice de refracción y color, los cuales se muestran en la **Tabla 5**.

Los resultados para el contenido de humedad de las mieles, osciló entre el 24.25 y 29.66%, de acuerdo con algunos estándares de Malasia, las mieles de abejas sin aguijón comprenden un porcentaje de humedad por arriba del 18.5%, para el pH se obtuvieron valores del 3.33 hasta 4.46 y para acidez libre de 23.52 a 56.70 meq/kg, en cuanto a la conductividad eléctrica, °Brix e Índice de refracción fueron de 174.67 al 521.67 $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$, 71 al 47 g/100g y 1.46 al 1.47 respectivamente, por último los resultados obtenidos mostraron que las mieles presentaron colores que van desde el extra blanco, ámbar claro y ámbar oscuro de acuerdo con la escala de Pfund (**Tabla 3**).

Debido a que no existe una regulación oficial acerca de los estándares de calidad para las mieles de abejas sin aguijón, algunos autores han recolectado bases de datos para este tipo de mieles alrededor del mundo, siendo una de las más reconocidas los estándares establecidos en Malasia así como los elaborados por otros autores como Vit et al (2004). Así mismo los resultados obtenidos en este estudio se encuentran dentro de los estándares de calidad antes mencionados para la miel de abejas sin aguijón (ver **Tabla 4**) en los parámetros de humedad, °Brix y acidez libre, también se logra distinguir la diferencia entre la composición de este tipo de mieles contra las mieles de *Apis mellifera* en donde se obtuvieron mayor contenido de humedad y menor contenido de sólidos solubles totales, revelando la relación que existe entre estos dos parámetros en comparación, de la misma manera se observó una acidez libre mayor (56.70 meq/100g) en una de las muestras al estándar de referencia para las mieles de *Apis mellifera* cuyo valor máximo es de 50 meq/100g, los niveles altos de acidez libre en las

mieles de abejas sin aguijón se ven influenciados por el proceso de fermentación característico de las mismas debido a que las levaduras transforman los azúcares presentes en la miel en ácidos orgánicos teniendo también influencia en el pH (Nordin et al., 2018).

Tabla 4 Estándares de calidad para las mieles de abejas sin aguijón

Parámetro	Estándares IHC	Vit et al. (2004)	Estándares de Malasia
Humedad (g/100)	Máximo 20	Máximo 30	Máximo 35
Acidez libre (meq/100g)	Máximo 50	Mínimo 85	No aplicable
Contenido de cenizas (g/100g)	Máximo 0.5	Máximo 0.5	Máximo 1.0
pH	No aplicable	No aplicable	2.5-3.8
°Brix	Mínimo 60	Mínimo 50	Máximo 85
HMF (mg/kg)	Máximo 40	Máximo 40	Máximo 40

Tomado de (Nordin et al., 2018)

Chuttong et al (2016), Vit (2009) y da S. Sant'ana (2020) evaluaron las características fisicoquímicas de distintas especies de abejas sin aguijón provenientes de Brasil, Venezuela y Tailandia, en donde encontraron valores similares a los encontrados en este estudio, reportaron valores de humedad elevados comprendiendo desde el 19.3 hasta el 31%, pH promedio de 3.24 hasta 4.49, acidez libre de 25-592, 16.92-248.52 y de 16-37 meq/kg, conductividad eléctrica de 0.24 – 2.14, 0.24 – 2.14 y de 0.794 – 1.1 mS/cm y para °Brix se reportó un promedio de 71.2 a 77.7 g/100g en los tres estudios.

Tabla 5 Parámetros fisicoquímicos de las mieles abejas sin aguijón (*Melipona beecheii*)

	Humedad (%)	pH	Acidez libre (meq/kg)	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$)	°Brix (g/100 g)	Índice de refracción	Color (mm/Pfund)
M26	29.66±0.30 ^d	4.46±0.66 ^d	31.42±0.85 ^b	521.67±0.29 ^e	71.00±0.43 ^a	1.46±0.08 ^a	134.33±7.78
M16	25.27±0.37 ^a	4.12±0.13 ^c	56.70±0.10 ^e	413.00±0.21 ^c	74.00±0.40 ^b	1.47±0.04 ^{ab}	71.00±0.82
M19	24.25±0.36 ^a	4.26±0.56 ^c	48.74±1.21 ^d	341.33±0.01 ^b	73.50±0.36 ^b	1.47±0.03 ^b	82.33±4.041
M23	27.17±0.46 ^c	3.33±0.67 ^a	38.87±0.66 ^c	434.67±0.50 ^d	72.83±0.28 ^{ab}	1.47±0.3 ^b	78.33±1.154
M29	26.33±0.16 ^b	3.68±0.90 ^b	23.52±0.60 ^a	174.67±0.28 ^a	73.67±0.28 ^c	1.47±0.5 ^b	17.33±2.30

Las letras diferentes (a-e) muestran diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Tukey

También se han realizado estudios acerca de la composición fisicoquímica en mieles de abejas sin aguijón en México, pertenecientes a las especies *Melipona beecheii* en los estados de Yucatán, Veracruz, y Chiapas, en donde las mieles con mayor contenido de humedad se reportaron en las provenientes del estado de Chiapas (31.4%) y con el menor contenido en las de Yucatán (25.3%) mientras que en las mieles evaluadas se reportó como valor máximo de humedad 29.66%, estas variaciones se deben a que el contenido de humedad de las mieles de abejas sin aguijón está determinada por las condiciones climáticas, debido a que habitan en zonas tropicales suelen estar más expuestas a la lluvia y humedad del ambiente influyendo en el proceso de maduración de la miel y su posterior almacenamiento, también depende del contenido del agua del néctar y de las prácticas apícolas de cada región (Albores-Flores et al., 2020).

En pH se reportaron los valores más bajos para las mieles de Chiapas (2.2) seguidas por las de Yucatán (2.6) y encontrándose con valores similares ambas mieles provenientes del estado de Veracruz (3.3-3.2), así mismo el valor más alto de acidez libre se encontró en las mieles de Chiapas (206 meq/kg), seguidas por las de Yucatán (71.3 meq/kg) y Veracruz (56.7 meq/kg) (Ramírez-Miranda et al., 2021) el pH de estas mieles como se ha visto suele ser bajo y está relacionado con el contenido de acidez libre, en este parámetro el principal responsable de la acidez es el ácido glucónico y otros ácidos libres como el acético que se forma como consecuencia de la fermentación de la miel, el ácido málico, cítrico, fórmico, oxálico, pirúvico y succínico, se ha demostrado que el contenido de estos ácidos varía de acuerdo al origen botánico de la miel, en donde se ha visto que la miel de mielada presenta mayor acidez que la miel de flores. Otros ácidos que contribuyen en la acidez de la miel son los ácidos volátiles (caproico) y los ácidos fenólicos (Martínez et al., 2022).

En el contenido de °Brix se encontró que las mieles de Yucatán presentaron un valor ligeramente menor (73.3 g/100g) a las mieles de Veracruz evaluadas en este estudio (74 g/100g) (Moo-Huchin et al., 2015). En cuanto al color las mieles de Yucatán presentaron coloraciones Blanco, Ámbar claro, Ámbar y Ámbar oscuro de acuerdo con la escala de Pfund, mientras que las mieles evaluadas presentan tonalidades más bajas como la Extra blanco, el color de las mieles depende de su origen botánico que está relacionado a su vez con el contenido de minerales, estos están presentes en la miel y provienen casi exclusivamente del néctar, estos reaccionan con la materia orgánica formando compuestos pardos y a mayor cantidad de materia mineral mayor es la cantidad de compuestos y mayor es el color (Ortiz-Reyes et al., 2022). También se ha establecido la relación

entre el contenido de minerales y la conductividad eléctrica, en la cual también influyen el contenido de iones inorgánicos, algunos aminoácidos y ácidos orgánicos en solución los cuales son capaces de conducir electricidad cuando se someten a un campo eléctrico y se usa generalmente para el análisis del origen botánico.

7.2 Determinación de los Compuestos Bioactivos y Actividad Antioxidante

Los resultados del contenido de Fenoles y Flavonoides presentes en las cinco mieles evaluadas se muestran en la **Tabla 6**. Los resultados variaron entre 9.27-31.80 mg EAG/100 g y 1.98-4.14 mg EQ/100 g de miel para fenoles y flavonoides respectivamente. El contenido de fenoles y flavonoides se encuentran dentro de lo reportado por otros autores ([Shamsudin et al., 2019](#); [Sousa et al., 2016](#)). El margen de variación entre los resultados obtenidos podría deberse a que el contenido de compuestos bioactivos de las mieles se ve afectado por el origen floral, la fuente del néctar, el clima y la temporada del año en que se recolecta la miel, así como las condiciones de cosecha. Por lo que el contenido de compuestos bioactivos diferirá en cada tipo de miel.

En cuanto a la actividad antioxidante, los porcentajes de inhibición frente a los radicales ABTS y DPPH (**Tabla 6**) fueron de 16.60-47.08% y 31.74-50.67% respectivamente, [Abu Bakar et al. \(2017\)](#), reportaron valores de inhibición contra el radical ABTS, que oscilaron entre el 22.9-59.02%, [Jiménez et al. \(2016\)](#), evaluaron la actividad antioxidante en miel de abejas sin aguijón mexicanas, encontrando porcentajes de inhibición para DPPH de 0.8-46.9%.

Comúnmente se relaciona la capacidad antioxidante de un alimento con su contenido de compuestos bioactivos, siendo los fenoles y flavonoides los responsables de dicha actividad. En este estudio se encontró que los fenoles tienden a influir en la inhibición del radical DPPH (0.35) y los flavonoides en el radical ABTS (0.28). Sin embargo ambas proporciones no se consideran tan significativamente altas como para ser las únicas responsables de la actividad antioxidante de las mieles evaluadas. De acuerdo con [Shamsudin et al. \(2019\)](#), la capacidad antioxidante de la miel está dada por la interacción de varios de sus componentes, como

pueden ser compuestos bioactivos, ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos, enzimas, entre otros, pudiendo provocar entre ellos un efecto sinérgico potenciando así la actividad antioxidante.

Tabla 6 Contenido de flavonoides, fenoles y actividad antioxidante de las muestras de miel de abejas sin agujón (*Melipona beecheii*)

Muestra	Flavonoides (mg EQ)*	Fenoles (mg EAG)**	ABTS (%)***	DPPH (%)***
M26	3.87±0.27 ^{ab}	25.57±0.99 ^b	47.08±0.59 ^a	31.74±0.22 ^d
M16	3.27±0.89 ^b	31.80±0.75 ^a	28.41±0.46 ^c	41.77±0.04 ^{bc}
M19	3.48±0.49 ^b	28.85±0.27 ^b	36.51±0.93 ^b	44.93±0.26 ^b
M23	4.14±0.37 ^a	23.95±0.26 ^b	33.80±0.78 ^{bc}	50.67±0.04 ^a
M29	1.98±0.44 ^c	9.27±0.67 ^c	16.60±0.52 ^d	37.19±0.59 ^c

*(mg EQ) mg equivalentes de quercetina /100 g de miel. ** (mg EAG) mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel. *** (%) porcentaje de inhibición.

Las letras diferentes (a-d) muestran diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Tukey

7.3 Ensayos de inhibición Enzimática

Todos los extractos de miel de abejas sin agujón evaluados en este estudio mostraron valores de inhibición para la enzima ureasa que oscilaron entre 45 y 85%, siendo la miel M26 la que obtuvo valores de inhibición más bajo de las cinco muestras y la miel M23 el valor más alto de inhibición (**Figura 6**). Matongo y Nwodo (2014) realizaron un estudio in vitro para inhibir la ureasa de *Helicobacter pylori* utilizando fracciones de miel, obteniendo porcentajes de inhibición del 45-48% en mieles de abejas sin agujón provenientes de Turquía. Aunque se ha visto que la inhibición de lagunas enzima está ligada al contenido de fenoles y flavonoides y más específicamente a la formación de un enlace covalente entre los grupos funcionales – OH de los flavonoides al sitio activo de la enzima (Kafarski & Talma, 2018), en este estudio no se encontró correlación significativa entre el contenido de fenoles (0.22) y para los flavonoides se encontró una relación negativa (-0.53) (**Tabla 7**).

Sin embargo hay algunos otros componentes en la miel de abejas sin aguijón que también podrían interferir con la inhibición enzimática. Sánchez-Chino (2019) informó que algunos componentes de la miel, como los ácidos orgánicos y algunos péptidos, podrían actuar como agentes quelantes de metales, esto debido a su capacidad de formar múltiples enlaces con los iones metálicos, la ureasa al ser una metaloenzima dependiente de níquel podría estar viendo afectada por dicha actividad, lo que explicaría el alto porcentaje de inhibición de las mieles evaluadas y la baja correlación con los compuestos bioactivos a pesar de que algunas de las muestras presentan un alto contenido de fenoles y flavonoides, sin embargo no se descarta la posibilidad de que también pudiera deberse a un efecto sinérgico y disminuir así la actividad de la ureasa en este ensayo.

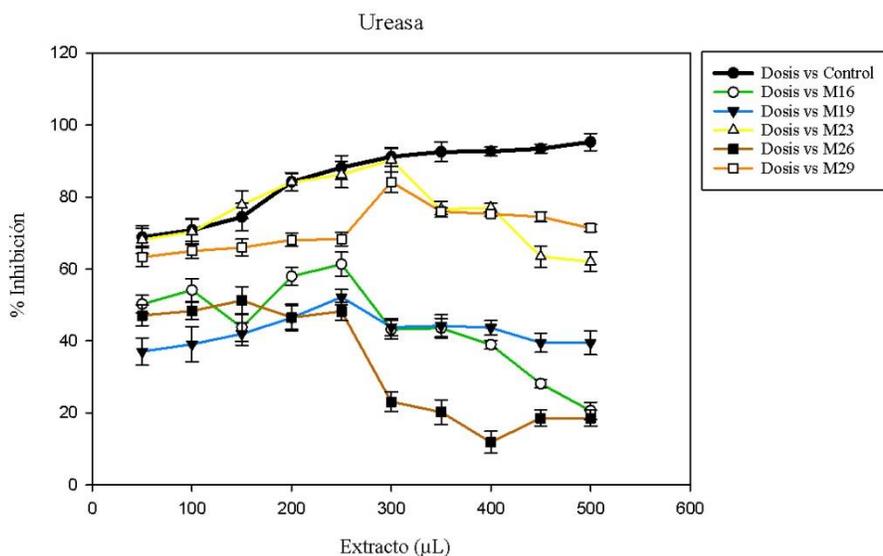


Figura 6 Porcentaje de inhibición de la enzima Ureasa con respecto a la dosis de extracto

Con respecto a la enzima elastasa, se obtuvo un valor de inhibición máximo de 47% para la miel M29, las mieles M16 y M19 obtuvieron valores similares (44-43%) a la misma concentración de extracto y un mínimo de 27% para la miel M23 (Figura 7). Wittenauer et al. (2015), obtuvieron valores de 20-97-41.48%, para esta misma enzima probando la capacidad inhibitoria del frijol negro (*Glycine max*), de igual manera Bahadır-Acikara et al. (2019) obtuvieron valores de 37.5-51.7% para la actividad inhibitoria de *Podospermum canum* sobre las enzimas colagenasa, elastasa y hialuronidasa, atribuyéndole estos efectos al

contenido de compuestos bioactivos presentes en dichas plantas, principalmente de los flavonoides

Se han realizado varios estudios entorno al contenido de compuestos bioactivos en distintas mieles de abejas sin aguijón (da S. Sant’ana et al., 2020; A. C. dos Santos et al., 2021a), encontrando principalmente fenoles, flavonoides y ácidos orgánicos, los cuales podrían interferir en la actividad inhibitoria de la elastasa. Jakimuik et al. (2021), le atribuyeron el potencial inhibitorio de estos compuestos a la saturación del doble enlace que poseen algunos flavonoides presentes en la miel para acoplarse y unirse a la elastasa producida por neutrófilos humanos, inhibiendo su actividad enzimática, lo que corrobora la hipótesis de que los flavonoides presentes en la miel están relacionados de manera directa (0.66) con el potencial inhibitorio contra la elastasa.

Tabla 7 Correlación entre el contenido de compuestos bioactivos, actividad antioxidante y potencial inhibitorio de los extractos de miel de abejas sin aguijón (*Melipona beecheii*)

Variables	β -glucuronidasa	Elastasa	Ureasa	DPPH	ABTS	Flavonoides	Fenoles
Fenoles	0.18	-0.47**	0.22	0.35	-0.54**	-0.23	-
Flavonoides	0.25	0.66***	-0.53**	-0.12	0.28	-	-
ABTS	0.31	0.22	-0.3	-0.62***	-	-	-
DPPH	-0.53**	0.05	0.42*	-	-	-	-
Ureasa	-0.58***	-0.51**	-	-	-	-	-
Elastasa	0	-	-	-	-	-	-
β -glucuronidasa	-	-	-	-	-	-	-

Cerca de +1 o -1 indica una relación fuerte y cerca de 0 indica una relación débil/sin relación

Todas las mieles mostraron un potencial inhibitorio $\geq 80\%$ contra la enzima β -glucuronidasa (**Figura 8**), siendo las mieles M29 y M19 las que mostraron mayor inhibición. Gholamhoseinian et al. (2021), probaron el potencial inhibidor de 120 extractos de plantas sobre la enzima β -glucuronidasa, obteniendo porcentajes de inhibición del 65% o menos, inclusive en algunos extractos no se reportó ningún efecto inhibitorio contra esta enzima

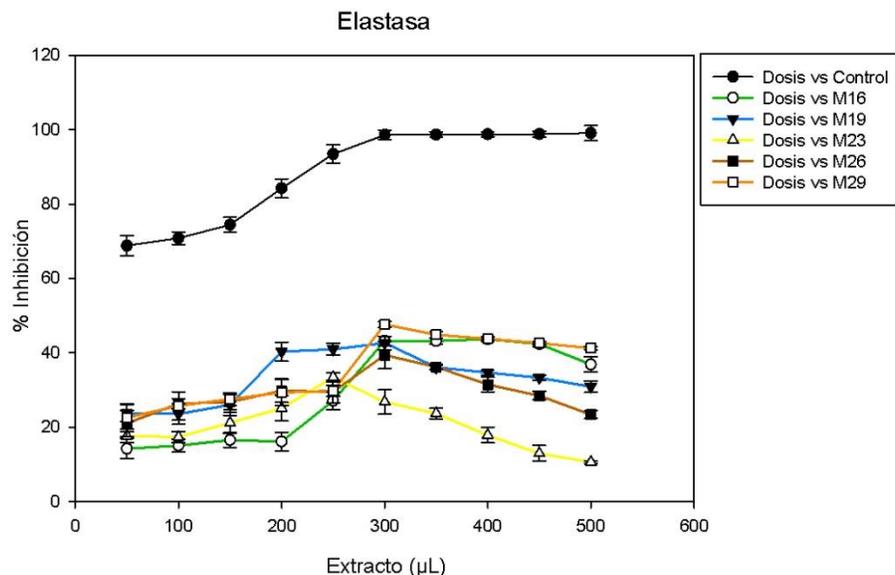


Figura 7 Porcentaje de inhibición de la enzima Elastasa con respecto a la dosis de extracto

En otro estudio realizado por Sun et al. (2020) midieron el efecto de 36 flavonoides sobre la β -glucuronidasa mostrando un potencial inhibidor del 70-90%.

Esto podría indicar que los flavonoides serían los posibles responsables de dicha actividad en este estudio, tal como lo describen Liew et al. (2020), identificando el mecanismo de acción de los flavonoides sobre la actividad de la β -glucuronidasa al unirse estos por medio de los anillos A y C al sitio activo de la enzima formando enlaces covalentes entre sí. Sin embargo, no se encontró una correlación significativa (0.18 y 0.25) entre el contenido de fenoles y flavonoides respectivamente de las mieles evaluadas con respecto a la actividad inhibitoria de la enzima, lo que posiblemente indicaría que existen otros componentes que están influyendo para lograr dicha inhibición. Ayyadurai et al (2023), probaron el efecto hepatoprotector de la suplementación de ácido D-glucónico para reducir los niveles de β -glucuronidasa en ratas teniendo resultados positivos.

La miel de abejas sin aguijón posee características únicas, como una mayor acidez que la miel convencional de *Apis mellifera* (Al-Hatamleh et al., 2020). Esto se debe a que durante el proceso de elaboración y maduración de la miel las abejas secretan algunas enzimas, como la glucosa oxidasa, esta enzima transforma las moléculas de glucosa en ácido glucónico, este ácido orgánico es uno de los más abundantes dentro de la composición de la miel de abejas

sin aguijón (Shamsudin et al., 2019). Este tipo de ácido así como algunos otros también pudieran estar interactuando sinérgicamente junto con los flavonoides para lograr la inhibición de la β -glucuronidasa en este estudio.

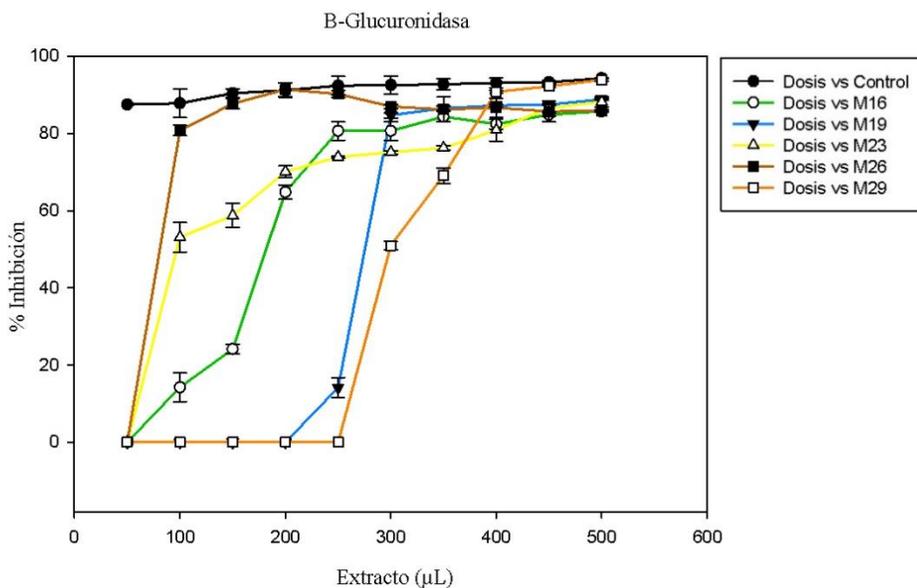


Figura 8 Porcentaje de inhibición de la enzima β -glucuronidasa con respecto a la dosis de extracto

8 CONCLUSIONES

Las variaciones en la composición química de las mieles de abejas sin aguijón dependen de distintos factores, se identificaron valores bajos de pH, de sólidos solubles totales y conductividad eléctrica, alto contenido de humedad, acidez libre y distintas tonalidades de colores entre las muestras evaluadas, así mismo se encontró que los parámetros fisicoquímicos evaluados estaban dentro de los estándares establecidos para las mieles de abejas sin aguijón.

La miel de abejas sin aguijón evaluadas en este estudio presentaron variaciones en cuanto al contenido de compuestos bioactivos, estas se deben a factores como origen floral, clima, estación del año y forma de cosecha, así mismo la actividad antioxidante de las mieles de abejas sin aguijón se relacionó al efecto sinérgico de varios de sus componentes y no únicamente al contenido de fenoles y flavonoides.

Los extractos de miel mostraron un porcentaje de inhibición promedio aproximada de $\geq 50\%$ a una concentración de 250 μL para la ureasa y un máximo de 85% de inhibición en dos de las muestras atribuyéndole el efecto sinérgico de los flavonoides y otros componentes de la miel como ácidos orgánicos y aminoácidos que pudieran actuar como agentes quelantes.

En cuanto a la actividad antiinflamatoria por medio de los extractos de miel, se observó una actividad media de la inhibición de la elastasa (40-47%), atribuyéndole esta actividad a la afinidad de los flavonoides presentes en la miel para acoplarse al sitio activo de la enzima.

El efecto hepatoprotector de los extractos contra la enzima β -glucuronidasa, pudiera estar correlacionada a la sinergia entre los flavonoides y los ácidos orgánicos presentes en las mieles, logrando inhibir casi por completo esta enzima mostrando una inhibición concentración dependiente.

9 BIBLIOGRAFÍA

Abd Jalil, M. A., Kasmuri, A. R., & Hadi, H. (2017). Stingless Bee Honey, the Natural Wound Healer: A Review. *Skin Pharmacology and Physiology*, 30(2), 66-75. <https://doi.org/10.1159/000458416>

Abu Bakar, M. F., Sanusi, S., Abu Bakar, F., Cong, O., & Mian, Z. (2017). Physicochemical and Antioxidant Potential of Raw Unprocessed Honey From Malaysian Stingless Bees. *Pakistan Journal of Nutrition*, 16, 888-894. <https://doi.org/10.3923/pjn.2017.888.894>

Ahmed, A. U. (2011). An overview of inflammation: Mechanism and consequences. *Frontiers in Biology*, 6(4), 274-281. <https://doi.org/10.1007/s11515-011-1123-9>

Aktaş Karaçelik, A., & Sahin, H. (2018). Determination of enzyme inhibition and antioxidant activity in some chestnut honeys. *Foods and Raw materials*, 6, 210-218. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2018-1-210-218>

Albores-Flores, V., Saavedra-Camacho, E., López-García, J. A., Grajales-Conesa, J., & Córdova-Albores, L. C. (2020). Physicochemical characterization, antioxidant and antifungal activity of three stingless bee pollen aggregate (Apidae: Meliponini) from Soconusco, Chiapas. *Mexican Journal of Phytopathology*, 39(1), Article 1. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2009-4>

Al-Hatamleh, M. A. I., Boer, J. C., Wilson, K. L., Plebanski, M., Mohamud, R., & Mustafa, M. Z. (2020). Antioxidant-Based Medicinal Properties of Stingless Bee Products: Recent Progress and Future Directions. *Biomolecules*, 10(6), 923. <https://doi.org/10.3390/biom10060923>

Ali, H., Abu Bakar, F., Majid, M., & Muhammad, N. (2020, abril 7). *In vitro anti-diabetic activity of stingless bee honey from different botanical origins*. 4(5), 1421-1426.

Aljadi, A. M., & Kamaruddin, M. Y. (2004). Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, 85(4), 513-518. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00596-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00596-4)

Al-Rooqi, M. M., Mughal, E. U., Raja, Q. A., Hussein, E. M., Naeem, N., Sadiq, A., Asghar, B. H., Moussa, Z., & Ahmed, S. A. (2023). Flavonoids and related privileged scaffolds as potential urease inhibitors: A review. *RSC Advances*, *13*(5), 3210-3233. <https://doi.org/10.1039/D2RA08284E>

Alvarez-Suarez, J. M., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T. Y., Mazzoni, L., & Giampieri, F. (2014). The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. *Foods*, *3*(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/foods3030420>

Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., Brenciani, A., Mazzoni, L., Gasparrini, M., González-Paramás, A. M., Santos-Buelga, C., Morroni, G., Simoni, S., Forbes-Hernández, T. Y., Afrin, S., Giovanetti, E., & Battino, M. (2018). *Apis mellifera* vs *Melipona beecheii* Cuban polyfloral honeys: A comparison based on their physicochemical parameters, chemical composition and biological properties. *LWT*, *87*, 272-279. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.079>

Asús, N., Luna, C., Petkovic, E., Díaz, J., Sosa, P., & Salomón, S. (2019). Prevención de enfermedades no transmisibles a través del índice inflamatorio de la dieta. *Revista Jornadas de Investigación; año 11, n° 11*. <https://repositorio.umaza.edu.ar/handle/00261/1413>

Ávila, S., Hornung, P. S., Teixeira, G. L., Malunga, L. N., Apea-Bah, F. B., Beux, M. R., Beta, T., & Ribani, R. H. (2019a). Bioactive compounds and biological properties of Brazilian stingless bee honey have a strong relationship with the pollen floral origin. *Food Research International*, *123*, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.068>

Ávila, S., Hornung, P. S., Teixeira, G. L., Malunga, L. N., Apea-Bah, F. B., Beux, M. R., Beta, T., & Ribani, R. H. (2019b). Bioactive compounds and biological properties of Brazilian stingless bee honey have a strong relationship with the pollen floral origin. *Food Research International*, *123*, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.068>

Ayyadurai, V. A. S., Deonikar, P., & Fields, C. (2023). Mechanistic Understanding of D-Glucaric Acid to Support Liver Detoxification Essential to Muscle Health Using a Computational Systems Biology Approach. *Nutrients*, *15*(3), 733. <https://doi.org/10.3390/nu15030733>

Bahadır Acikara, Ö., İlhan, M., Kurtul, E., Šmejkal, K., & Küpeli Akkol, E. (2019). Inhibitory activity of *Podosperrum canum* and its active components on collagenase,

elastase and hyaluronidase enzymes. *Bioorganic Chemistry*, *93*, 103330. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103330>

Baltaş, N., Sahin, H., & Alpay Karaoğlu, Ş. (2017). Evaluation of Anti-Helicobacter Pylori Activity and Urease Inhibition by Some Turkish Authentic Honeys. *Journal of Food Science and Engineering*, *7*. <https://doi.org/10.17265/2159-5828/2017.02.001>

Bertoncelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M., & Golob, T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, *105*(2), 822-828. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.060>

Biluca, F. C., Bernal, J., Valverde, S., Ares, A. M., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2019). Determination of Free Amino Acids in Stingless Bee (Meliponinae) Honey. *Food Analytical Methods*, *12*(4), 902-907. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-01427-x>

Biluca, F. C., Braghini, F., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (*Meliponinae*). *Journal of Food Composition and Analysis*, *50*, 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.05.007>

Biluca, F. C., da Silva, B., Caon, T., Mohr, E. T. B., Vieira, G. N., Gonzaga, L. V., Vitali, L., Micke, G., Fett, R., Dalmarco, E. M., & Costa, A. C. O. (2020). Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (*Meliponinae*). *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, *129*, 108756. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108756>

Biluca, F. C., de Gois, J. S., Schulz, M., Braghini, F., Gonzaga, L. V., Maltez, H. F., Rodrigues, E., Vitali, L., Micke, G. A., Borges, D. L. G., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2017). Phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (*Meliponinae*). *Journal of Food Composition and Analysis*, *63*, 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.039>

Bosques-Padilla, F. J., Remes-Troche, J. M., González-Huezo, M. S., Pérez-Pérez, G., Torres-López, J., Abdo-Francis, J. M., Bielsa-Fernandez, M. V., Camargo, M. C., Esquivel-Ayanegui, F., Garza-González, E., Hernández-Guerrero, A. I., Herrera-Goepfert, R., Huerta-Iga, F. M., Leal-Herrera, Y., Lopéz-Colombo, A., Ortiz-Olvera, N. X., Riquelme-Pérez, A.,

- Sampieri, C. L., Uscanga-Domínguez, L. F., & Velarde-Ruiz Velasco, J. A. (2018). IV consenso mexicano sobre *Helicobacter pylori*. *Revista de Gastroenterología de México*, 83(3), 325-341. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2018.05.003>
- Braghini, F., Biluca, F. C., Gonzaga, L. V., Kracik, A. S., Vieira, C. R. W., Vitali, L., Micke, G. A., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2019). Impact of short-term thermal treatment on stingless bee honey (Meliponinae): Quality, phenolic compounds and antioxidant capacity. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(7), e13954. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13954>
- Chahuan, J., Pizarro, M., & Riquelme, A. (2022). Métodos diagnósticos para la detección de infección por *Helicobacter pylori*. ¿Cuál y cuándo deben solicitarse? *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*, 52(1), Article 1. <https://doi.org/10.52787/agl.v52i1.176>
- Chai, E. Z. P., Siveen, K. S., Shanmugam, M. K., Arfuso, F., & Sethi, G. (2015). Analysis of the intricate relationship between chronic inflammation and cancer. *Biochemical Journal*, 468(1), 1-15. <https://doi.org/10.1042/BJ20141337>
- Chuttong, B., Chanbang, Y., Sringarm, K., & Burgett, M. (2016). Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from South East Asia (Thailand). *Food Chemistry*, 192, 149-155. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.089>
- Codex Alimentarius. (1981). *STANDARD FOR HONEY CXS 12-1981*. https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcode%252Fstandards%252FCXS%2B12-1981%252Fcxs_012e.pdf
- Costa dos Santos, A., Biluca, F. C., Braghini, F., Gonzaga, L. V., Fett, R., & Costa, A. C. O. (2021b). Phenolic composition and biological activities of stingless bee honey: An overview based on its aglycone and glycoside compounds. *Food Research International*, 147, 110553. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110553>
- da S. Sant'ana, R., de Carvalho, C. A. L., Oda-Souza, M., de A. Souza, B., & de S. Dias, F. (2020). Characterization of honey of stingless bees from the Brazilian semi-arid region. *Food Chemistry*, 327, 127041. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127041>

- Döring, G. (1994). The Role of Neutrophil Elastase in Chronic Inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 150(6_pt_2), S114-S117. https://doi.org/10.1164/ajrccm/150.6_Pt_2.S114
- Encinas Sotillos, A., Pulido Izquierdo, L., Fernández Azuela, M., & Cano López, J. M. (2017). Factores asociados a la hepatotoxicidad por fármacos. *Medicina Integral*, 37(9), 390-394.
- Eteraf-Oskouei, T., & Najafi, M. (2013). Traditional and Modern Uses of Natural Honey in Human Diseases: A Review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(6), 731.
- Fernandes, R. T., Rosa, I. G., & Conti-Silva, A. C. (2020). Honey from Tiúba stingless bees (*Melipona fasciculata*) produced in different ecosystems: Physical and sensory studies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(9), 3748-3754. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10415>
- García-Cortés, M., Andrade, R. J., Lucen, M. I., González-Grande, R., Camargo, R., Fernández-Bonilla, E., Martos, J. V., & Alcántara, R. (2005). Hepatotoxicidad secundaria a fármacos de uso común. *Gastroenterología y Hepatología*, 28(8), 461-472. <https://doi.org/10.1157/13079002>
- Gela, A., Hora, Z. A., Kebebe, D., & Gebresilassie, A. (2021). Physico-chemical characteristics of honey produced by stingless bees (*Meliponula beccarii*) from West Showa zone of Oromia Region, Ethiopia. *Heliyon*, 7(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05875>
- Gholamhoseinian, A., Sharififar, F., Jalaeian, H., & Shahouzehi, B. (2021). Screening of Plants Hydro-Alcoholic Extracts from Kerman for their Inhibition of β -Glucuronidase Activity. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11, 7921-7931. <https://doi.org/10.33263/BRIAC111.79217931>
- Gomes, V. V., Dourado, G., Costa, S., Lima, A., Silva, E., Bandeira, A., & Taube, P. (2017). Evaluation of the quality of honey commercialized in Western Para, Brazil. *Revista Virtual de Química*, 9(2), 815-826. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170050>

Guevara Tirado, A. (2024). Alteraciones en el perfil hepático y otros marcadores de pacientes asintomáticos que acuden a exámenes de rutina en un área urbana de Lima, Perú. *Revista Virtual de la Sociedad Paraguaya de Medicina Interna*, 11(1), 4. <https://doi.org/10.18004/rvspmi/2312-3893/2024.e11122405>

Hernández Cortez, C., Aguilera Arreola Ma, G., & Castro Escarpulli, G. (2019). *Situación de las enfermedades Gastrointestinal diseases, situation in gastrointestinales en México Mexico*. 31.

Hernández-Reyes, R. D., Torices-Escalante, E., Domínguez-Camacho, L., Hernández-Reyes, R. D., Torices-Escalante, E., & Domínguez-Camacho, L. (2020). Diagnóstico rápido de Helicobacter Pylori por medio de solución de lombarda. *Endoscopia*, 32, 342-346. <https://doi.org/10.24875/end.m20000257>

Hungerford, N. L., Tan, B. L. L., Tinggi, U., Zawawi, N., Farrell, M., Tsai, H. H., Hnatko, D., Swann, L. J., Kelly, C. L., R. Anuj, S., Webber, D. C., T. Were, S., & T. Fletcher, M. (2020). Analysis of Environmental Contaminants in Australian Honey and Comparison to Stingless Bee Honey from Queensland and Malaysia. *Proceedings*, 36(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/proceedings2019036101>

Icaza-Chávez, M. E., Tanimoto, M. A., Huerta-Iga, F. M., Remes-Troche, J. M., Carmona-Sánchez, R., Ángeles-Ángeles, A., Bosques-Padilla, F. J., Blancas-Valencia, J. M., Grajales-Figueroa, G., Hernández-Mondragón, O. V., Hernández-Guerrero, A. I., Herrera-Servín, M. A., Huitzil-Meléndez, F. D., Kimura-Fujikami, K., León-Rodríguez, E., Medina-Franco, H., Ramírez-Luna, M. A., Sampieri, C. L., Vega-Ramos, B., & Zentella-Dehesa, A. (2020). Consenso mexicano sobre detección y tratamiento del cáncer gástrico incipiente. *Revista de Gastroenterología de México*, 85(1), 69-85. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2019.10.001>

INSP. (2021). *Presentan panorama de las enfermedades crónicas en México*. <https://www.insp.mx/avisos/presentan-panorama-de-las-enfermedades-cronicas-en-mexico>

Jakimiuk, K., Gesek, J., Atanasov, A. G., & Tomczyk, M. (2021). Flavonoids as inhibitors of human neutrophil elastase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36(1), 1016-1028. <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1927006>

- Jimenez, M., Beristain, C. I., Azuara, E., Mendoza, M. R., & Pascual, L. A. (2016). Physicochemical and antioxidant properties of honey from *Scaptotrigona mexicana* bee. *Journal of Apicultural Research*, 55(2), 151-160. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1205294>
- Kafarski, P., & Talma, M. (2018). Recent advances in design of new urease inhibitors: A review. *Journal of Advanced Research*, 13, 101-112. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.01.007>
- Karak, S., Nag, G., & De, B. (2017). Metabolic profile and β -glucuronidase inhibitory property of three species of *Swertia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(1), 105-111. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.07.007>
- Keitelman, I. A. (2019). *Mecanismos que controlan el desarrollo de inflamación mediada por neutrófilos*. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/83408>
- Kumar, M., Sikri, N., Chahal, S., Sharma, J., Sharma, B., Yadav, P., Bhardwaj, M., Vashishth, D., Kadyan, P., Kataria, S. K., & Dalal, S. (2021). Urease Inhibitory Kinetic Studies of Various Extracts and Pure Compounds from *Cinnamomum* Genus. *Molecules*, 26(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/molecules26133803>
- Lee, K.-K., Kim, J.-H., Cho, J.-J., & Choi, J.-D. (1999). Inhibitory Effects of 150 Plant Extracts on Elastase Activity, and Their Anti-inflammatory Effects. *International Journal of Cosmetic Science*, 21(2), 71-82. <https://doi.org/10.1046/j.1467-2494.1999.181638.x>
- Leoz, M. L., Sánchez, A., Carballal, S., Ruano, L., Ocaña, T., Pellisé, M., Castells, A., Balaguer, F., & Moreira, L. (2016). Síndromes de predisposición a cáncer gástrico y cáncer pancreático. *Gastroenterología y Hepatología*, 39(7), 481-493. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2015.11.009>
- Liew, S. Y., Sivasothy, Y., Shaikh, N. N., Mohd Isa, D., Lee, V. S., Choudhary, M. I., & Awang, K. (2020). β -Glucuronidase inhibitors from Malaysian plants. *Journal of Molecular Structure*, 1221, 128743. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128743>
- Maia-Silva, C., Limão, A. a. C., Silva, C. I., Imperatriz-Fonseca, V. L., & Hrncir, M. (2020). Stingless Bees (*Melipona subnitida*) Overcome Severe Drought Events in the Brazilian

Tropical Dry Forest by Opting for High-Profit Food Sources. *Neotropical Entomology*, 49(4), 595-603. <https://doi.org/10.1007/s13744-019-00756-8>

Majid, M., Ellulu, M. S., & Abu Bakar, M. F. (2020). Melissopalynological Study, Phenolic Compounds, and Antioxidant Properties of *Heterotrigona itama* Honey from Johor, Malaysia. *Scientifica*, 2020, e2529592. <https://doi.org/10.1155/2020/2529592>

Martínez, T. C., Osorio, C. G., Muñiz, J. G. G., Ávila, J. A., & Valverde, R. 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. <https://www.redalyc.org/journal/423/42375500006/html/>

Matongo, F., & Nwodo, U. U. (2014). In vitro assessment of *Helicobacter pylori* ureases inhibition by honey fractions. *Archives of Medical Research*, 45(7), 540-546. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.09.001>

Melo. (2020). Stingless Bees (Meliponini) | Request PDF. *Encyclopedia of social insects*, 1-18.

Moo-Huchin, V., Gonzalez-Aguilar, G., Lira-Maas, J., Perez-Pacheco, E., Estrada-Leon, R., Moo-Huchin, M., & Sauri-Duch, E. (2015). Physicochemical Properties of *Melipona beecheii* Honey of the Yucatan Peninsula. *Journal of Food Research*, 4(5), Article 5. <https://doi.org/10.5539/jfr.v4n5p25>

Moreno Otero, R. (2002). Hepatotoxicidad por fármacos. *Revista Española de Reumatología*, 1, 60-71.

Multhoff, G., Molls, M., & Radons, J. (2012). Chronic Inflammation in Cancer Development. *Frontiers in Immunology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00098>

Murillo-Zavala, A. M., Mero-Veliz, G. Y., & Tuárez-Sosa, G. K. (2023). Infección por *Helicobacter pylori* y su relación con patologías gástricas en pacientes de Latinoamérica. *MQRInvestigar*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.56048/MQR20225.7.1.2023.1063-1088>

Narayanaswamy, R., Kok Wai, L., & Ismail, I. S. (2015). In Silico Analysis of Selected Honey Constituents as Human Neutrophil Elastase (HNE) and Matrix Metalloproteinases

(MMP 2 and 9) Inhibitors. *International Journal of Food Properties*, 18(10), 2155-2164.
<https://doi.org/10.1080/10942912.2014.963870>

Ngaini, Z., Hussain, H., Kelabo, E. S., Wahi, R., & Farooq, S. (2023). Chemical profiling, biological properties and environmental contaminants of stingless bee honey and propolis. *Journal of Apicultural Research*, 62(1), 131-147.
<https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1948745>

Nordin, A., Sainik, N. Q. A. V., Chowdhury, S. R., Saim, A. B., & Idrus, R. B. H. (2018). Physicochemical properties of stingless bee honey from around the globe: A comprehensive review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 73, 91-102.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.06.002>

Nweze, J. A., Okafor, J. I., Nweze, E. I., & Nweze, J. E. (2017). Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of two stingless bee honeys: A comparison with *Apis mellifera* honey from Nsukka, Nigeria. *BMC Research Notes*, 10(1), 566.
<https://doi.org/10.1186/s13104-017-2884-2>

Oleson, L., & Court, M. H. (2008). Effect of the β -glucuronidase inhibitor saccharolactone on glucuronidation by human tissue microsomes and recombinant UDP-glucuronosyltransferases[†]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(9), 1175-1182.
<https://doi.org/10.1211/jpp.60.9.0009>

Ortiz-Reyes, L. Y., Quiroz-García, D. L., Arreguín-Sánchez, M. L., & N, R. F. (2022). Origen botánico y caracterización físicoquímica de la miel de meliponinos (Apidae:Meliponini) de Teocelo, Veracruz, México. *POLIBOTÁNICA*, 54.
<https://doi.org/10.18387/polibotanica.54.10>

Paniagua, A. C., Posada, L. M. C., & Muñoz, P. J. A. (2017). Toxicidad hepática causada por medicamentos: Revisión estructurada. *Revista colombiana de Gastroenterología*, 32(4), Article 4. <https://doi.org/10.22516/25007440.177>

Peláez-Acero, A., Cobos-Velasco, J. E., González-Lemus, U., Espino-Manzano, S. O., Aguirre-Álvarez, G., González-Montiel, L., Figueira, A. C., & Campos-Montiel, R. G. (2021). Bioactive compounds and antibacterial activities in crystallized honey liquefied with

ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 76, 105619.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105619>

Pereira, D. M., Andrade, C., Valentão, P., & Andrade, P. B. (2017). Natural Products as Enzyme Inhibitors. En *Natural Products Targeting Clinically Relevant Enzymes* (pp. 1-18). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9783527805921.ch1>

Pimentel, T. C., Rosset, M., de Sousa, J. M. B., de Oliveira, L. I. G., Mafaldo, I. M., Pintado, M. M. E., de Souza, E. L., & Magnani, M. (2022). Stingless bee honey: An overview of health benefits and main market challenges. *Journal of Food Biochemistry*, 46(3), e13883. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13883>

Pimentel-González, D. j., Jiménez-Alvarado, R., Hernández-Fuentes, A. d., Figueira, A. c., Suarez-Vargas, A., & Campos-Montiel, R. g. (2016). Potentiation of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Artisanal Honeys Using Specific Heat Treatments. *Journal of Food Biochemistry*, 40(1), 47-52. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12186>

Quintero-Lira, A., López-Oliveira, A. C. F., Martínez-Juárez, V. M., Razo-Rodríguez, O. E. D., Alvarado, R. J.-, & Montiel, R. G. C. (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), Article 2. <https://doi.org/10.19136/jeeos.a3n2.3405>

Ramanauskienė, K., Stelmakienė, A., Briedis, V., Ivanauskas, L., & Jakštas, V. (2012). The quantitative analysis of biologically active compounds in Lithuanian honey. *Food Chemistry*, 132(3), 1544-1548. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.007>

Ramírez-Miranda, I., Betancur-Ancona, D., & Moguel-Ordóñez, Y. (2021). Physicochemical and Microbiological Standards of Honey Produced by Genus. *Journal of Apicultural Science*, 65(2), 197-216. <https://doi.org/10.2478/jas-2021-0016>

Ramón-Sierra, J., Martínez-Guevara, J. L., Pool-Yam, L., Magaña-Ortiz, D., Yam-Puc, A., & Ortiz-Vázquez, E. (2020). Effects of phenolic and protein extracts from *Melipona* beecheii honey on pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Science and Biotechnology*, 29(7), 1013-1021. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00744-4>

Rios Choque, M. A. (2023). *Evaluación costo-efectividad de dos esquemas terapéuticos paracetamol/metamizol y paracetamol/tramadol para el manejo del dolor agudo postoperatorio en paciente del servicio de traumatología en la Clínica San Juan de Dios 2021*. <https://hdl.handle.net/20.500.12920/13092>

Roubik, D. W. (2023). Stingless Bee (Apidae: Apinae: Meliponini) Ecology. *Annual Review of Entomology*, 68, 231-256. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120120-103938>

Ruiz-Ruiz, J. C., Matus-Basto, A. J., Acereto-Escoffié, P., & Segura-Campos, M. R. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolic compounds isolated from *Melipona beecheii* honey. *Food and Agricultural Immunology*, 28(6), 1424-1437. <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1347148>

Salvador, L. A., Taori, K., Biggs, J. S., Jakoncic, J., Ostrov, D. A., Paul, V. J., & Luesch, H. (2013). Potent Elastase Inhibitors from Cyanobacteria: Structural Basis and Mechanisms Mediating Cytoprotective and Anti-Inflammatory Effects in Bronchial Epithelial Cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(3), 1276-1290. <https://doi.org/10.1021/jm3017305>

Sánchez-Chino, X. M., Jiménez-Martínez, C., Ramírez-Arriaga, E., Martínez-Herrera, J., Corzo-Ríos, L. J., & García, L. M. G. (2019). Actividad antioxidante y quelante de metales de las mieles de *Melipona beecheii* y *Frieseomelitta nigra* originarias de Tabasco, México. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 22(0), Article 0. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.186>

Santos, A. C. dos, Biluca, F. C., Braghini, F., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2021a). Phenolic composition and biological activities of stingless bee honey: An overview based on its aglycone and glycoside compounds. *Food Research International*, 147, 110553. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110553>

Santos, S., Maia, M., Barros, A., & Gouvinhas, I. (2023). Assessment of Phenolic Content, Antioxidant and Anti-Aging Activities of Honey from *Pittosporum undulatum* Vent. Naturalized in the Azores Archipelago (Portugal). *Applied Sciences*, 13(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/app13031788>

Sekikawa, C., Kurihara, H., Goto, K., & Takahashi, K. (2002). Inhibition of β -Glucuronidase by Extracts of *Chondria crassicaulis*. *北海道大学水産科学研究彙報*, 53(1), 27-30.

- Shamsudin, S., Selamat, J., Sanny, M., Abd. Razak, S.-B., Jambari, N. N., Mian, Z., & Khatib, A. (2019). Influence of origins and bee species on physicochemical, antioxidant properties and botanical discrimination of stingless bee honey. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 239-264. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1576730>
- Silva O, R., Montes, J. F., García-Valero, J., & Olloquequi, J. (2015). Efectores celulares de la respuesta inflamatoria en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Revista médica de Chile*, 143(9), 1162-1171. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872015000900009>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. En *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Soehnein, O., Steffens, S., Hidalgo, A., & Weber, C. (2017, agosto 21). Rol de los neutrófilos en la inflamación crónica. *Nat Rev Immunol*, 17. <https://gruposrespiratoriointegramedica.wordpress.com/2017/08/21/rol-de-los-neutrofilos-en-la-inflamacion-cronica/>
- Sousa, J., Souza, E., Marques, G., Benassi, M., Gullón, B., Pintado, M., & Magnani, M. (2016). Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 645-651. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.058>
- Sun, C.-P., Yan, J.-K., Yi, J., Zhang, X.-Y., Yu, Z.-L., Huo, X.-K., Liang, J.-H., Ning, J., Feng, L., Wang, C., Zhang, B.-J., Tian, X.-G., Zhang, L., & Ma, X. (2020). The study of inhibitory effect of natural flavonoids toward β -glucuronidase and interaction of flavonoids with β -glucuronidase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 143, 349-358. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.057>
- Tanaka, T., Kawase, M., & Tani, S. (2004). α -Hydroxyketones as inhibitors of urease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(2), 501-505. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2003.10.017>
- Tejada Cifuentes, F. (2010). Hepatotoxicidad por Fármacos. *Revista Clínica de Medicina de Familia*, 3(3), 177-191.

- Tuksitha, L., Chen, Y.-L. S., Chen, Y.-L., Wong, K.-Y., & Peng, C.-C. (2018). Antioxidant and antibacterial capacity of stingless bee honey from Borneo (Sarawak). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(2), 563-570. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2018.03.007>
- Urrialde, R., Gómez-Cifuentes, A., Pintos, B., Gómez-Garay, M. A., Cifuentes, B., Urrialde, R., Gómez-Cifuentes, A., Pintos, B., Gómez-Garay, M. A., & Cifuentes, B. (2022). Compuestos bioactivos de origen vegetal: Desarrollo de nuevos alimentos. *Nutrición Hospitalaria*, 39(SPE3), 8-11. <https://doi.org/10.20960/nh.04302>
- Villacrés-Granda, I., Coello, D., Proaño, A., Ballesteros, I., Roubik, D. W., Jijón, G., Granda-Albuja, G., Granda-Albuja, S., Abreu-Naranjo, R., Maza, F., Tejera, E., González-Paramás, A. M., Bullón, P., & Alvarez-Suarez, J. M. (2021). Honey quality parameters, chemical composition and antimicrobial activity in twelve Ecuadorian stingless bees (Apidae: Apinae: Meliponini) tested against multiresistant human pathogens. *LWT*, 140, 110737. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110737>
- Villalba Herrera, E. W. (2014). INFLAMACION I. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 2261.
- Vit, P. (2009). Caracterización físicoquímica de mieles de abejas sin aguijón (Meliponini) de Venezuela. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 40(2), 7-12.
- Vit, P., Medina, M., & Enriquez, M. E. (2004). Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *Bee World*, 85(11), 2-5.
- Wittenauer, J., Mäcke, S., Sußmann, D., Schweiggert-Weisz, U., & Carle, R. (2015). Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. *Fitoterapia*, 101, 179-187. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.01.005>
- Zamora, L. G., & Arias, M. L. (2011). Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón. *REVISTA BIOMÉDICA*, 22(2), Article 2. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v22i2.101>