



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**“Caracterización físico química y funcional de miel,
polen, jalea real y propóleo para la formulación de un
alimento de diseño”.**

Tesis que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

Presenta:

L.N. GLORIA ISABEL CAMACHO BERNAL

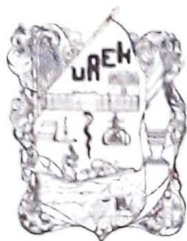
Director(a) de Tesis

DRA. NELLY DEL SOCORRO CRUZ CANSINO

Co-Director(a) de Tesis

DR. ERNESTO ALANÍS GARCÍA

San Agustín Tlaxiaca Hgo. a 12 de agosto del 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias de la Salud
School of Medical Sciences
Área Académica de Medicina
Department of Medicine
Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

6 AGO 2019



29/julio/2019
AAM/MCBS/082/2019

Asunto: Asignación de Jurado de Examen

Camacho Bernal Gloria Isabel

Alumna de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada " Caracterización fisicoquímica y funcional de miel, polen, jalea real y propóleo para la formulación de un alimento de diseño" con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE	Dr. Ernesto Alanís García
PRIMER VOCAL	Dra. Nelly del Socorro Cruz Cansino
SECRETARIO	Dr. José Alberto Ariza Ortega
SUPLENTE	MNH Zuli Guadalupe Calderón Ramos
SUPLENTE	MNH Arianna Omaña Covarrubias

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.



Atentamente
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

M.C. ESP. ADRIÁN MOYA ESCALERA
DIRECTOR

DRA. LYDIA LOPEZ PONTIGO
COORDINADORA DE POSGRADO ICSA

DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ
COORDINADOR DEL PROGRAMA

Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n Carretera
Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo,
Mexico. C.P. 42160
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308
medicina@uaeh.edu.mx



Durante el desarrollo de este trabajo, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 627382.

Se extiende el agradecimiento a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por permitir la realización de estudios de posgrado en los laboratorios pertenecientes a esta universidad.

Así mismo, un profundo y grato agradecimiento a los responsables de los laboratorios en los que se desarrolló este proyecto: Laboratorio de Tecnofuncionalidad de Alimentos y Laboratorio de Alimentos Funcionales y Nutracéuticos, ya que sin sus instalaciones, equipamiento, reactivos e insumos en general, no se hubiesen logrado los objetivos marcados en este proyecto.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

El amor recibido, la dedicación y paciencia son parte fundamental de estas dedicatorias y agradecimientos, primeramente, a Dios por permitirme llegar hasta este momento.

Un reconocimiento y dedicatoria especial a mi familia, especialmente a mis padres por ser los forjadores de lo que soy como persona, por acompañarme en este camino, pero sobre todo por haberme dado el impulso suficiente para cumplir mis aspiraciones, por enseñarme que, aunque el trayecto a las metas esté lleno de obstáculos debo ser más fuerte para vencerlos y sacar lo mejor hasta de los malos momentos, pero además por el simple hecho de ser mis padres y contar con la dicha de tenerlos a mi lado.

Agradezco y dedico, así mismo a mi compañero de vida, Jorge por ser aquella persona que en estos 6 años (y un poquito más), me ha enseñado a cambiar todo lo malo en mí para ser cada vez mejor persona, gracias por tu compañía en cada noche cuando los pendientes de la maestría no acababan, por escuchar mis interminables pláticas sobre mis experimentos que aunque no entendías del todo, prestabas atención y lo más importante es que debo reconocer que eres un luchador que me has demostrado el valor de la vida y que no importa lo difícil que parezca el panorama podemos vencer todos los obstáculos que se nos presenten, hasta aquellos que parecerían los más amargos.

El desarrollo de la tesis no lo puedo catalogar como algo fácil, pero lo que sí puedo afirmar con certeza es cada momento vivido, cada investigación, cada experimento, congresos a los que asistí valió completamente la pena, sin embargo todo ello no hubiera sido posible sin el apoyo de todo mi comité: la maestra Zuli, la maestra Arianna, el Dr. Ariza, el Dr. Alanís y la Dra. Nelly, de los cuáles agradezco cada segundo de su dedicación para mi formación, los cumpleaños compartidos, las risas, los abrazos, los conocimientos que me transmitieron. Recuerdo especialmente, los días de congreso con la Dra. Nelly que hablábamos de lo académico y no académico, pero además por haberme dado la oportunidad de trabajar como su tesista en estos 2 años y muchos otros momentos que dejaron en mí todos ustedes, me los llevo en el corazón y no saldrán nunca.

Así mismo, no puedo dejar de lado al apicultor Narcizo Hugo García León, creador de la marca de productos de la colmena ANIHU de Tulancingo, Hidalgo, sin su apoyo este proyecto no hubiera sido lo mismo, gracias por su confianza, calidez, compromiso colectivo otorgado a este trabajo que trajo consigo un sinnúmero de experiencias y conocimientos.

Un reconocimiento especial a mis compañeros de laboratorio, a Quina por ser aquella que me sacaba de dudas sobre los experimentos, por tu sencillez y calidez dentro de los espacios que compartimos, a Chava por tu disposición en todo momento para apoyar en las situaciones que se presentaban, por las pláticas en los momentos de ocio y por las jornadas que parecían interminables en el HPLC, gracias Mariel por tu amistad que aunque pudo haber surgido cuando éramos niñas, tuvo el momento justo y agradezco haber tenido la oportunidad de conocerte como colega, gracias por tanto, por las risas, los abrazos, a Lili por su compañía dentro del laboratorio que aunque fue poco tiempo el que coincidimos aportaste algo a este proyecto, gracias Ale por tu amistad, paciencia y comprensión cuando apenas era una aprendiz, Luis Jiménez por ser mi compañero de laboratorio, por los cumpleaños y risas, Luis Traspeña y Lis, por su apoyo y disposición por ayudarme en mis experimentos sobre todo en la microbiología, pero también por todo aquel tiempo que compartimos, espero de corazón sigan creciendo como profesionales, Bety gracias por hacerme reír tanto con esa sencillez y que te caracteriza y finalmente a Alicia por brindarme ánimos para ser constante en este camino, fue poco el tiempo que coincidimos pero de calidad.

Por último y no menos importante a mis compañeras y amigas de maestría, Ena, Aby y Ale, sin ustedes no hubiera sido igual, gracias por haber elegido compartir y vivir esta experiencia profesional conmigo, aprendí mucho de ustedes, gracias por la motivación durante el camino, por haber construido tantos y tantos recuerdos dentro y fuera de los salones de clase, espero que este gran lazo que creamos perdure mucho tiempo después de haber culminado esta etapa de nuestras vidas, saben que las quiero y aprecio mucho.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	4
2.1 Generalidades	4
2.1.1 Biología de las abejas	4
2.1.2 Producción de miel y su importancia a escala mundial, nacional y estatal	6
2.1.2.1 Producción mundial	6
2.1.2.2 Producción nacional	7
2.1.2.3 Producción estatal	8
2.1.3 Composición fisicoquímica y nutricional de los productos de la colmena	10
2.1.3.1 Composición de la miel	10
2.1.3.2 Composición del polen	11
2.1.3.3 Composición del propóleo	12
2.1.3.4 Composición de la jalea real	12
2.1.4 Propiedades de los alimentos vinculadas a su empleo	13
2.1.4.1 Propiedades nutricionales y funcionales	14
2.1.4.2 Alimentos funcionales y alimentos de diseño	14
2.2 Antecedentes de problema	15
2.2.1 Beneficios del consumo de los productos de la colmena en la salud humana	15
2.2.1.1 Efecto terapéutico en el cáncer	15
2.2.1.2 Efecto terapéutico en las enfermedades crónico degenerativas	15
2.2.1.3 Efecto terapéutico en enfermedades inflamatorias	18
2.2.1.4 Otros efectos benéficos a la salud	19
2.3 Planteamiento del problema	19
III. JUSTIFICACIÓN	21
IV. HIPÓTESIS	22
V. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo general	22
5.2 Objetivos específicos	22
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	23
6.1 Tipo de estudio	23
6.2 Diagrama del diseño experimental	23
6.3 Obtención de la muestra	24
6.4 Análisis químico proximal	25
6.4.1 Determinación de % Humedad	25
6.4.1.1 Principio	25
6.4.1.2 Procedimiento	25
6.4.2 Determinación % Cenizas	25
6.4.2.1 Principio	25
6.4.2.2 Procedimiento	26
6.4.3 Determinación de % Proteínas	26
6.4.3.1 Principio	26

6.4.3.2	Procedimiento	26
6.4.4	Determinación de % Extracto etéreo	27
6.4.4.1	Principio	27
6.4.4.2	Procedimiento	27
6.4.5	Determinación de pH	28
6.4.5.1	Principio	28
6.4.5.2	Procedimiento	28
6.4.6	Acidez titulable	28
6.4.6.1	Principio	28
6.4.6.2	Procedimiento	28
6.4.7	Sólidos solubles	29
6.4.7.1	Principio	29
6.4.7.2	Procedimiento	29
6.4.8	Hidroximetilfurfural (HMF)	29
6.4.8.1	Principio	29
6.4.8.2	Procedimiento	29
6.4.9	Viscosidad	30
6.4.9.1	Principio	30
6.4.9.2	Procedimiento	30
6.4.10	Análisis microbiológico	30
6.4.10.1	Principio	30
6.4.10.2	Procedimiento	30
6.4.11	Contenido de antioxidantes	30
6.4.11.1	Compuestos fenólicos totales	30
6.4.11.1.1	Principio	30
6.4.11.1.2	Procedimiento	31
6.4.11.2	Ácido ascórbico	31
6.4.11.2.1	Principio	31
6.4.11.2.2	Procedimiento	31
6.4.11.3	Betalainas y betaxantinas	32
6.4.11.3.1	Principio	32
6.4.11.3.2	Procedimiento	32
6.4.12	Actividad antioxidante	33
6.4.12.1	Ensayo DPPH ^{•+}	33
6.4.12.1.1	Principio	33
6.4.12.1.2	Procedimiento	33
6.4.12.2	Ensayo ABTS ^{•+}	34
6.4.12.2.1	Principio	34
6.4.12.2.2	Procedimiento	34
6.4.12.3	Ensayo FRAP	34
6.4.12.3.1	Principio	34
6.4.12.3.2	Procedimiento	35
6.4.12.4	Actividad quelante	35
6.4.12.4.1	Principio	35
6.4.12.4.2	Procedimiento	35
6.4.12.5	Evaluación sensorial	36
6.4.12.5.1	Principio	36

6.4.12.5.2	Procedimiento	36
6.4.12.6	Análisis estadístico	37
VII.	RESULTADOS	38
7.1	Análisis químico proximal	38
7.2	pH, sólidos solubles totales y acidez	39
7.3	Hidroximetilfurfural (HMF)	40
7.4	Viscosidad	40
7.5	Análisis microbiológico	41
7.6	Contenido de antioxidantes	41
7.6.1	Betaninas y betaxantinas	41
7.6.2	Compuestos fenólicos totales	43
7.6.3	Contenido de ácido ascórbico	44
7.7	Actividad antioxidante	46
7.7.1	Actividad antioxidante por el método de DPPH ^{•+}	46
7.7.2	Actividad antioxidante por el método de ABTS ^{•+}	47
7.7.3	Actividad antioxidante por el método de FRAP	48
7.8	Actividad quelante	49
7.9	Caracterización del alimento de diseño	50
7.9.1	Evaluación sensorial del alimento de diseño	50
7.9.2	pH y sólidos solubles	51
7.9.3	Viscosidad	51
7.9.4	Análisis microbiológico	52
7.9.5	Contenido de antioxidantes	52
7.9.5.1	Betaninas y betaxantinas	52
7.9.5.2	Fenoles	54
7.9.5.3	Contenido de ácido ascórbico	55
7.9.6	Actividad antioxidante	56
7.9.6.1	Actividad antioxidante por el método de DPPH ^{•+}	56
7.9.6.2	Actividad antioxidante por el método de ABTS ^{•+}	57
7.9.6.3	Actividad antioxidante por el método de FRAP	58
7.9.7	Actividad quelante	59
VIII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	61
8.1	Propiedades nutricionales, físicoquímicas y microbiológicas de productos de la colmena de Tulancingo, Hidalgo.	61
8.1.1	Propiedades nutricionales	61
8.1.1.1	Humedad	61
8.1.1.2	Cenizas	62
8.1.1.3	Extracto etéreo	63
8.1.1.4	Proteínas	63
8.1.1.5	Hidratos de carbono	64
8.1.2	Propiedades físicoquímicas	65
8.1.2.1	pH	65
8.1.2.2	Sólidos solubles totales (° Brix)	65
8.1.2.3	Acidez titulable	66
8.1.2.4	Hidroximetilfurfural (HMF)	67
8.1.2.5	Viscosidad	68
8.1.3	Análisis microbiológico	69

8.2	Propiedades funcionales de productos de la colmena de Tulancingo y Mérida	70
8.2.1	Contenido de antioxidantes	70
8.2.1.1	Betalaínas (betaninas y betaxantinas)	70
8.2.1.2	Fenoles	71
8.2.1.3	Ácido ascórbico	73
8.2.2	Actividad antioxidante y actividad quelante	73
8.2.2.1	Actividad antioxidante por DPPH ^{•+}	74
8.2.2.2	Actividad antioxidante por ABTS ^{•+}	75
8.2.2.3	Actividad antioxidante por FRAP	76
8.2.2.4	Actividad quelante	77
8.3	Formulación y microbiología del alimento de diseño y comparación de las propiedades fisicoquímicas y funcionales entre el producto Mérida y el formulado.	78
8.3.1	Evaluación sensorial	78
8.3.1.1	Color	79
8.3.1.2	Olor	79
8.3.1.3	Sabor	80
8.3.1.4	Consistencia	80
8.3.1.5	Aceptación general	81
8.3.2	Propiedades fisicoquímicas del producto Mérida y formulado	81
8.3.2.1	pH	81
8.3.2.2	Sólidos solubles	82
8.3.2.3	Viscosidad	82
8.3.3	Microbiología del producto formulado	82
8.3.4	Contenido de antioxidantes del producto Mérida y formulado	83
8.3.4.1	Betalaínas (betaninas y betaxantinas)	83
8.3.4.2	Fenoles totales	83
8.3.4.3	Ácido ascórbico	84
8.3.5	Actividad antioxidante y quelante del producto Mérida y formulado	85
8.3.5.1	Actividad antioxidante por DPPH ^{•+}	85
8.3.5.2	Actividad antioxidante por ABTS ^{•+}	86
8.3.5.3	Actividad antioxidante por FRAP	86
8.3.5.4	Actividad quelante	87
IX.	CONCLUSIONES	89
X.	RECOMENDACIONES	90
XI.	REFERENCIAS	91
XII.	ANEXOS	110

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción de miel de China, Turquía, EUA, Argentina Ucrania y México, del 2000 al 2015.	7
Tabla 2. Producción de miel en toneladas a nivel nacional en 2018.	8
Tabla 3. Resumen de la producción de miel en 2018 (toneladas) en Hidalgo por municipio.	9
Tabla 4. Compuestos antioxidantes más importantes en miel y polen.	11
Tabla 5. Resultados de la composición química proximal expresada en porcentaje de miel clara, miel oscura, jalea real, polen y propóleo provenientes de Tulancingo.	38
Tabla 6. Resultados de pH, sólidos solubles totales y acidez de miel clara, miel oscura, jalea real, polen y propóleo, provenientes de Tulancingo, Hidalgo.	40
Tabla 7. Resultados de Hidroximetilfurfural (HMF) de miel clara y miel oscura, provenientes de Tulancingo, Hidalgo.	40
Tabla 8. Comparativa de pH y sólidos solubles totales del alimento de diseño y formulación Mérida	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de castas de las abejas.	5
Figura 2. Diseño experimental parte 1.	23
Figura 3. Diseño experimental parte 2.	24
Figura 4. Cinética de viscosidad de la miel a temperatura ambiente.	41
Figura 5. Contenido de betaninas de miel clara, oscura, jalea real, polen y propóleo Tulancingo y Mérida.	42
Figura 6. Contenido de betaxantinas de miel clara, oscura, jalea real, polen y propóleo Tulancingo y Mérida.	43
Figura 7. Contenido de fenoles de alimento de diseño y producto Mérida.	44
Figura 8. Contenido de ácido ascórbico de miel clara, oscura, jalea real, polen y propóleo Tulancingo y Mérida.	45
Figura 9. Actividad antioxidante por el método de DPPH ^{••} de miel clara, oscura, jalea real, polen y propóleo Tulancingo y Mérida.	46
Figura 10. Actividad antioxidante por el método de ABTS ^{••} de miel clara, oscura, jalea real, polen y propóleo Tulancingo y Mérida.	47
Figura 11. Actividad antioxidante por el método de FRAP de miel clara, oscura, jalea real, polen y propóleo Tulancingo y Mérida.	48
Figura 12. Actividad quelante de miel clara, oscura, jalea real, polen y propóleo Tulancingo y Mérida.	49
Figura 13. Resultados de la evaluación sensorial de las 6 formulaciones diseñadas, para los atributos de color, olor, sabor, consistencia y aceptación general, 30 panelistas.	50
Figura 14. Cinética de la viscosidad del alimento de diseño y producto comparativo a temperatura ambiente.	52
Figura 15. Contenido de betaninas de alimento de diseño y producto Mérida.	53
Figura 16. Contenido de betaxantinas de alimento de diseño y producto Mérida.	54
Figura 17. Contenido de fenoles de alimento de diseño y producto Mérida.	55
Figura 18. Contenido de ácido ascórbico de alimento de diseño y producto Mérida.	56
Figura 19. Actividad antioxidante por el método de DPPH ^{••} de alimento de diseño y producto Mérida	57

Figura 20. Actividad antioxidante por el método de ABTS ^{•+} de alimento de diseño y producto Mérida	58
Figura 21. Actividad antioxidante por el método de FRAP de alimento de diseño y producto Mérida	59
Figura 22. Actividad quelante (%) de alimento de diseño y producto Mérida	60

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Porcentaje de humedad	25
Ecuación 2. Porcentaje de cenizas.	26
Ecuación 3. Porcentaje de proteína total	27
Ecuación 4. Porcentaje de extracto etéreo	27
Ecuación 5. Determinación del contenido de betalaínas y betaxantinas	32
Ecuación 6. Porcentaje de actividad quelante.....	36

ABREVIATURAS

10-HDA: ácido 10-hydroxy-2-decenoico

ABTS^{•+}: ácido 2,2 azinobis (3-etilbenzotiazilina-6-sulfonato)

ADA: American Dietetic Association

ANOVA: análisis de varianza

DCPI: 2,6-diclorofenolindofenol

DMSO: dimetilsulfóxido

DNS: ácido 3,5 dinitrosalicílico

DPPH^{•+}: 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo

EAC: equivalentes de ácido ascórbico

EAG: equivalentes de ácido gálico

EB: equivalentes de betaninas

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EI: equivalentes de indicaxantinas

ET: equivalentes de trolox

EUA: Estados Unidos de América

FAOSTAT: Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

HDL: High Density Lipoprotein

HMF: Hidroximetilfurfural

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

LDL: Low Density Lipoprotein

mEq: miliequivalentes

pH: potencial de hidrógeno

rpm: revoluciones por minuto

RT: recuento total

TPTZ: 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina

UFC: unidades formadoras de colonias

VRBG: agar bilis rojo violeta glucosado

RESUMEN

La miel, jalea real, polen y propóleo, son productos de la colmena ampliamente conocidos y utilizados en la medicina alternativa desde épocas antiguas, las evidencias científicas, apuntan a que pudieran constituirse como auxiliares terapéuticos en diversas patologías, a partir de su valor nutrimental, y propiedades funcionales, provenientes de sus características físicoquímicas. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar las propiedades físicas, químicas y funcionales de la miel, jalea real, polen y propóleo, producida por *Apis mellífera L.*, para la formulación de un alimento de diseño. Como fase inicial se caracterizaron las muestras con respecto a sus propiedades físicoquímicas y funcionales. Posteriormente, se procedió a la obtención del alimento de diseño, para lo cual se elaboraron previamente un total de 6 formulaciones, todas ellas cumpliendo con el 15% de la recomendación de antioxidantes, tomando como base el contenido de fenoles expresados como mg EAG (Equivalentes de Ácido Gálico), el cual varió en el rango de 150.17 a 153.08 mg EAG/30g, a continuación, para conocer el nivel de agrado de dichas mezclas, se realizó una evaluación sensorial a un total de 30 panelistas, encontrando que la formulación que contenía 50% de miel oscura, 25% de polen, 16% de miel clara, 7% de propóleo en extracto y 2% de jalea real tuvo los mayores puntajes para los atributos de color, olor, sabor, consistencia y aceptación general, consolidándose así como el alimento de diseño.

En una siguiente fase, se caracterizó dicha formulación, encontrando que, al compararlo con un producto similar originario de Mérida, presentó menor pH (3.82) y sólidos solubles totales (71 ± 1.15 °Brix), evidenciando también buenas propiedades antioxidantes al encontrar un más contenido de betaninas (2.25 ± 0.00 mg EB/100g), betaxantinas (2.63 ± 0.01 mg EI/100g), contenido de fenoles (550.29 ± 15.72 mg EAG/100g), contenido de ácido ascórbico (286.86 ± 4.62 mg EAC/100g), así mismo mayor actividad antioxidante por el método de DPPH^{•+} (1385.66 ± 27.53 µmol ET/100g), ABTS^{•+} (45.81 ± 1.90 mg EAC/100g), FRAP (4069.16 ± 52.04 mmol Fe (II)/100g) y una actividad quelante 3.91% mayor con respecto a dicho producto de Mérida. Por lo tanto, se espera que el alimento de diseño obtenido aporte beneficios a la salud humana previniendo enfermedades relacionadas al estrés oxidativo o bien como un auxiliar en el control y tratamiento de las mismas.

Palabras clave: alimento de diseño, caracterización, *Apis mellífera L.*, productos de la colmena

ABSTRACT

Honey, royal jelly, pollen and propolis, are products of hive widely known and used in alternative medicine since ancient times, the scientific evidence, suggest that they could be constituted as therapeutic auxiliary in various pathologies, from their nutritional value, and functional properties, coming from its physical chemical characteristics. Therefore, the objective of the present investigation was to determinate the physicochemical and functional properties of honey, royal jelly, pollen and propolis, produced by *Apis mellifera L*, for the formulation of a design food.

As an initial phase, the samples were characterized with respect to their physicochemical and functional properties. Later, the design food was obtained, where a total of six formulations, where elaborated, all complying with 15% of the antioxidant recommendation, based on the phenols content expressed as mg GAE (Galic Acid Equivalents), varying in the range of 150.17 to 153.08 mg GAE / 30g, afterward, to know the level of pleasure of these mixtures, a sensory evaluation was made with a total of 30 panelists. The formulation that had 50% dark honey, 25% pollen, 16% clear honey, 7% propolis extract and 2% royal jelly presented the highest scores for the attributes of color, odor, taste, consistency and general acceptance, selecting this formulation as the design food.

In a following phase, the design food was characterized compared with a similar product from Mérida, the design food showed lower pH (3.82) and total soluble solids (71 ± 1.15 ° Brix), also showed high antioxidant properties with higher content of betanins (2.25 ± 0.00 mg BE / 100g), betaxanthines (2.63 ± 0.01 mg IE / 100g), content of phenols (550.29 ± 15.72 mg GAE / 100g), ascorbic acid content (286.86 ± 4.62 mg AAE / 100g), as well as greater antioxidant activity by the DPPH^{•+} method (1385.66 ± 27.53 µmol ET / 100g), ABTS^{•+} (45.81 ± 1.90 mg EAC / 100g), FRAP (4069.16 ± 52.04 mmol Fe (II)/100g) and a 3.91% higher chelating activity with respect to said Mérida product. Therefore, it is expected that the design food obtained will provide benefits to human health by preventing diseases related to oxidative stress or as an auxiliary in the control and treatment of them.

Keywords: Design food, antioxidants,, *Apis mellifera L*., bee hive products

I. INTRODUCCIÓN

Debido a la importancia que los alimentos tienen en la salud humana, ha crecido el interés por determinar las cualidades que aportan los alimentos, a partir de sus componentes químicos y su funcionalidad en la salud, como auxiliares para el control y tratamiento de diversas enfermedades.

Los productos de la colmena no son la excepción, pues existen múltiples evidencias, acerca de los compuestos bioactivos que contienen y sus posibles efectos terapéuticos en la salud humana, así como los métodos para la determinación de estos. A partir de ello, se han llevado a cabo varias investigaciones científicas tanto clínicas como preclínicas, en las cuales se ha evidenciado su utilización en tres vertientes principales: efectos terapéuticos en el cáncer, en el tratamiento de las enfermedades crónicas no transmisibles y en las enfermedades inflamatorias.

Con respecto a los efectos benéficos de la jalea real se ha encontrado que tiene un potencial para el control de la glucosa, efectos antiinflamatorios, mejoramiento de la eritropoyesis, efecto estrogénico, mejoramiento de la inflamación renal y también como ergogénico (al mejorar la resistencia al ejercicio, aumentar la masa muscular y reducir la grasa corporal, en deportistas).

La miel, resulta también un producto valioso en la salud humana, pues se ha descrito su utilización como cardioprotector, hepatoprotector, hipoglucemiante (como un factor protector contra el estrés oxidativo) y para el mejoramiento de los niveles de lipoproteínas séricas.

Para el caso del polen, se han podido determinar sus propiedades como agente oncoterapéutico, hipoglucemiante, mejoramiento de las lipoproteínas séricas y antiinflamatorias.

Por último, el propóleo es otro producto de la colmena, del cual se han descrito beneficios en cuanto al control glicémico, como cardioprotector, y para el mejoramiento de la resistencia a la insulina.

Con base en lo anteriormente descrito, pudiera ser innovador formular un alimento de diseño, a través de la combinación de jalea real, miel, polen y propóleo en cantidades adecuadas, para establecer un efecto terapéutico en la salud humana.

II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades

2.1.1 Biología de las abejas

Las abejas son insectos sociales considerados himenópteros (del orden *Hymenoptera*), las cuales pertenecen al género *Apis*. Actualmente se conocen dos especies domesticadas la *Apis mellifera* (de origen occidental, nativa de Europa, Asia, África e introducida en América) y la *Apis cerana* (del sur y sureste de Asia) (1). Dentro de las características de los insectos sociales, se pueden mencionar la existencia de varias generaciones simultáneamente, cuidado cooperativo, existencia de castas estériles (individuos que no se reproducen dentro de las colmenas) y comportamiento altruista (2).

La dinámica poblacional de las colmenas es fundamental para entender el funcionamiento de la misma. En climas templados, durante la primavera comienza la época de cría, en la que aumenta la población de la colmena, que alcanza su máximo en verano y en otoño disminuye considerablemente. Las abejas nacidas en otoño son por esta razón más longevas, viviendo entre 90 y 140 días, para poder llegar a la primavera con suficiente población para protegerse de las adversidades climatológicas y de la baja disponibilidad de recursos (3)

El conjunto de abejas que descienden de una misma abeja reina se denomina colonia y ésta a su vez se compone de grupos de abejas con distintas funciones, denominados “castas”, los cuales son: la abeja reina, obrera y zángano (Figura 1) (3).



Figura 1. Tipos de castas de las abejas

La abeja reina, es la madre de los individuos de la colonia, es la única hembra que puede procrear (4). En cada colonia de abejas existe una sola abeja reina que mediante la emisión de feromonas mantiene unida la colmena y evita la formación de nuevas reinas (3). Días después de su nacimiento, en tiempo cálido, la reina se dirige al exterior para ser fecundada por los zánganos y esta fecundación le llegará para el resto de su vida, que dedicará a poner huevos para que nazcan nuevas obreras. La reina deposita un huevo en cada celda, si es sin fecundar dará un zángano, si es fecundado una obrera (5). Aunque pueden vivir hasta cinco años, generalmente se renuevan de forma natural cada dos o tres años, o artificialmente cada dos (3).

Las abejas obreras por su lado, son la casta más numerosa y que realiza la mayoría de las funciones en la colmena. Una colmena normal puede estar formada por 2000 a 8000 abejas obreras, dependiendo de la estación del año (3). Son hembras no fértiles que realizan las tareas domésticas desde la alimentación de las larvas, hasta la limpieza del panal (4). En primer lugar, las abejas son limpiadoras y realizan tareas de limpieza en las celdillas de los panales; después pasan a ser “nodrizas” (se ocupan del cuidado de las crías); posteriormente se convierten en cereras y construyen los panales de cera; más tarde son almacenadoras y colocan el alimento en las celdillas de miel y polen. Las abejas obreras de más edad son las guardianas y son las que evitan la entrada de abejas de otras colmenas; ventiladoras, que se encargan de generar corrientes de aire para mantener la constante la temperatura de la

colmena y para deshidratar el néctar y convertirlo en miel; su última tarea es la de pecoreadoras, es decir que se encargan de recoger el néctar y el polen de las flores (3).

Por último, los zánganos son los machos de la especie, nacen en primavera y mueren antes del invierno (4). La función del zángano es básicamente fecundar a la abeja reina. En el interior de la colmena sus funciones son más discutidas, aunque se considera que ayudan a mantener el calor de la colmena y a repartir el néctar (3).

Así es como el interés por estos insectos surgió de su interesante modo de vida y la capacidad para producir y transformar sus recursos para subsistencia, de tal modo que su crianza para la producción de miel y otros productos se practica desde la época precolombina, es decir desde ésta época surgió la apicultura como actividad económica de las civilizaciones antiguas (6).

2.1.2 Producción de miel y su importancia a escala mundial, nacional y estatal

La apicultura como actividad primaria, actualmente se encuentra en un proceso de revaloración y fortalecimiento, dada la rentabilidad que genera (7), es considerada como una opción estratégica capaz de proporcionar impactos favorables en los ámbitos social, económico y ambiental (8).

2.1.2.1 Producción mundial

Según Soto-Muciño (2017), la producción mundial de miel es del orden de 1.1 millones de toneladas, donde los países de China, Estados Unidos, Argentina, México, Canadá y Alemania concentran la mitad del total producido (Tabla 1) (9). De acuerdo a la información disponible por la FAO (Food and Agriculture Organization), indica que en los últimos 25 años no se registran cambios sustanciales en los niveles del intercambio comercial mundial de miel de abeja (10).

Tabla 1. Producción de miel de China, Turquía, EUA, Argentina Ucrania y México, del 2000 al 2015.

Año	China (1°)	Turquía (2°)	EUA (3°)	Argentina (4°)	Ucrania (5°)	México (6°)
2010	409,149	81,115	80,042	59,000	70,873	55,684
2011	431,907	94,245	67,294	74,000	70,300	57,783
2012	436,000	88,162	66,720	75,500	70,134	58,602
2013	466,300	94,694	83,000	78,000	73,713	56,906.81
2014	468,000	102,486	84,500	79,500	74,000	60,624.37
2015	469,000	103,000	86,007	80,000	74,100	61,881

Fuente: adaptado de Soto-Muciño 2017 (9).

2.1.2.2 Producción nacional

La apicultura en México tiene una gran importancia socioeconómica, ya que es considerada como una de las principales actividades pecuarias generadora de divisas. La producción de miel en México durante los últimos 15 años se ha mantenido alrededor de 51-57 mil toneladas en promedio, lo que le otorgó el sexto lugar durante 2015 y octavo en 2017 a escala mundial en producción de miel (9,11). La apicultura mexicana de acuerdo a datos reportados por FAOSTAT (Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database), 2016, en el periodo de 2015 la producción fue de 61,881 toneladas (Tabla 1) (12). Se estima que, en México, alrededor de 43 mil productores se dedican a la apicultura y se tiene el registro de 1.9 millones de colmenas. El principal destino de la miel mexicana es la Unión Europea (UE) y se ha fortalecido su presencia en Arabia Saudita, Angola y algunas Naciones de Centro América (9). La producción Nacional según datos del SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) en 2018, se concentra en entidades como Campeche, Jalisco, Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Quintana Roo y Yucatán, siendo ésta última la líder cuyo volumen promedio anual asciende a 11,558 toneladas y en menor proporción Puebla, Morelos, Guerrero e Hidalgo, el cual ocupa el lugar 13 en nivel de producción con un total de 1,380.02 toneladas (Tabla 2) (13).

Tabla 2. Producción de miel en toneladas a nivel nacional en 2018.

Estado	Producción por año (toneladas)
Yucatán	11,588.52
Campeche	8,226.11
Jalisco	5,667.40
Chiapas	5,473.66
Veracruz	4,842.39
Oaxaca	4,387.33
Quintana Roo	3,630.46
Puebla	2,453.67
Guerrero	1,993.71
Morelos	1,945.88
Zacatecas	1,809.50
Michoacán	1,809.13
Hidalgo	1,380.02
San Luis Potosí	1,168.87
Tlaxcala	1,038.66
México	982.59
Tamaulipas	855.4
Guanajuato	609.85
Sonora	528.2
Colima	472.79
Durango	471
Chihuahua	450.47
Nayarit	435.15
Tabasco	391.2
Coahuila	218.66
Nuevo León	215.48
Baja California Sur	210.36
Sinaloa	190.02
Querétaro	114.04
Baja California	99.62
Ciudad de México/DF	96.67

Fuente: SIAP (13).

2.1.2.3 Producción estatal

El estado de Hidalgo cuenta con una población apícola de 21,420 colmenas, con las cuales producen 1100-1200 toneladas de miel promedio por año según estadísticas del 2014 al 2017, cantidad que representa el 1.4% de la producción nacional. La zona de la Huasteca es la región apícola más importante, ya que en ella se ubican un total de 8,343 colmenas (39.0% del total estatal), mismas que producen un total de 370.7 toneladas de miel (48.0% de la producción estatal) (14).

De acuerdo con los datos reportados por el Anuario estadístico de la producción ganadera del 2018 del SIAP, el municipio de Tulancingo de Bravo se posiciona en el lugar número 12 de un total de 67 municipios productores, con un promedio de 18.31 toneladas por año de miel de donde San Felipe Orizatlán se ubica como el líder de producción en el estado de Hidalgo con 432.85 toneladas (Tabla 3) (13).

Tabla 3. Resumen de la producción de miel en 2018 (toneladas) en Hidalgo por municipio.

Lugar	Municipio	Producción (toneladas)
1	San Felipe Orizatlán	432.85
2	Huejutla de Reyes	232
3	Xochiatipan	166
4	Villa de Tezontepec	64.82
5	Atlapexco	52.45
12	Tulancingo de Bravo	18.31
15	San Bartolo Tutotepec	12.73
20	Atotonilco El Grande	7.29
25	Pisaflores	4.99
30	Chapulhuacán	4.07
35	Zimapán	3.65
40	Jacala de Ledezma	2.71
45	Ixmiquilpan	2.26
55	Tenango de Doria	1.2
60	Progreso de Obregón	0.66
65	Alfajayucan	0.37
66	Nicolás Flores	0.37
67	Atitalaquia	0.3

Fuente: modificado de SIAP (13).

2.1.3 Composición fisicoquímica y nutricional de los productos de la colmena

Diferentes moléculas o clases de compuestos de los productos de la colmena han sido aislados y caracterizados, con el objetivo de descubrir nuevos compuestos bio-activos contenidos en ellos, con el principal objetivo de buscar su papel biológico en la salud humana para posteriormente proporcionarles a los individuos nuevas opciones de tratamiento de origen natural, con pocos o nulos efectos secundarios (1).

2.1.3.1 Composición de la miel

La miel es el principal alimento producido por la abeja, que deriva del proceso digestivo del néctar de las flores (1). La composición y sus atributos nutricionales varían de acuerdo con el origen geográfico (15,16), de ello dependerán sus propiedades fisicoquímicas (humedad, contenido de cenizas, pH, azúcares totales, azúcares reductores, sacarosa, propiedades organolépticas y viscosidad) (16).

Es una solución compuesta al 80% por azúcares, principalmente fructuosa (38%) y glucosa (31%) y en menor proporción sacarosa y maltosa (1); muchos de ellos no se encuentran de forma natural en el néctar, sino que son formados durante los efectos de maduración y almacenamiento. Una dosis diaria de 20 g de miel cubre alrededor del 3% de la energía diaria requerida (17).

Tiene un pH promedio de 3.9 debido a la presencia de ácidos orgánicos (constituyen un 0.57%), el más importante es el ácido glucónico (1). Tiene una densidad de 1.4-1.41 a 20°C, aunque puede llegar a un peso específico de 1.44, lo cual equivale a un contenido de agua de 14% (18).

En cuanto al contenido de proteínas representan aproximadamente un 0.1-1.15%, el aminoácido más presente es la prolina (representa el 50% de los aminoácidos totales) (16), seguido por el ácido glutámico, alanina, fenilalanina, tirosina, leucina e isoleucina (1).

Las tres enzimas principales contenidas en la miel son oxidasa, catalasa y diastasa. El contenido de vitaminas en la miel es bajo, sin embargo, se puede encontrar vitamina K (filloquinona), vitamina B1, B2 y B6 y vitamina C (17).

Su contenido de minerales representa 0.04-2%, del cual el potasio es el más importante (1), contiene además trazas muy pequeñas de algunos metales como el bario, estroncio, cromo, níquel, cadmio, estaño, antimonio, talio y minerales como fósforo, azufre, calcio, magnesio, potasio, sodio, zinc, cobre y manganeso.

Los polifenoles son otro grupo importante de compuestos en la miel, a los cuales se les atribuye su potencial como marcadores bioquímicos de propiedades antioxidantes, en concentraciones de aproximadamente 20 mg/kg de miel, en la Tabla 4 se aprecian los principales flavonoides (17).

Tabla 4. Compuestos antioxidantes más importantes en miel y polen.

Producto de la colmena	Compuestos
Miel ¹	Quercetina, luteolina, kaempferol, apigenina, crisina, galangina
Polen ²	Quercetinas, kaempferol, isorhamnetina, kaempferol-3 glucósido, y quercetina-7-rhamnosida
Propóleo ³	Acacetina, ácido cinámico, cumarina, izalpina, kaempferido, prenilletina, viscidona y vanillina

Fuente: Álvarez Suárez, *et.al*, 2010 (17)¹; Cornara, *et.al*, 2017 (1)², Muñoz, *et.al*, 2001 (19)³.

2.1.3.2 Composición del polen

El polen es la parte reproductora masculina de las plantas, el cual es recogido por las abejas trabajadoras en forma de gránulos y a su vez es el alimento recolectado para las abejas en crecimiento. Se considera un alimento natural muy completo ya que contiene casi todos los nutrientes necesarios para la abeja con un alto contenido de fitoquímicos (20).

El porcentaje proteico puede representar del 2-60% de su composición; sin embargo, éste siempre dependerá del origen botánico del polen, el contenido de lípidos usualmente representa menos del 10% en seco (21).

Se han determinado diversos compuestos bioactivos en el polen, de los más relevantes son los taninos, esteroides, alcaloides, resinas, cumarinas y quinonas (20). Otros componentes importantes son los compuestos fenólicos y flavonoides, los cuales se presentan a detalle en la Tabla 4 (1).

2.1.3.3 Composición del propóleo

Es la sustancia resinosa de las abejas forasteras (*Apis mellifera* L.) derivado de la colecta de brotes y tejidos de plantas, después de mezclarlos con cera y polen resulta una sustancia maleable y compacta (22). Es una resina preparada por las abejas para sellar las grietas, mantener la humedad y temperatura estable de la colmena (23), por debajo de 15°C, se vuelve duro y quebradizo, normalmente se convierte en líquido entre los 60°C y 70°C, pero para algunas muestras el punto de fusión puede ser de hasta 100°C (24). Su composición química depende dramáticamente de su origen geográfico y floral (23).

Con el desarrollo de técnicas de separación y purificación como el HPLC, cromatografía de capa fina, cromatografía de gases (GC), espectroscopia de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear, han sido identificados diversos compuestos incluyendo flavonoides, terpenos, fenoles, ésteres, azúcares, hidrocarburos y elementos minerales (25–27). Los disolventes más utilizados para su extracción comercial y análisis químico son el etanol, propilenglicol, aceite y agua, muchos de los componentes antioxidantes y antibacterianos contenidos en el propóleo son solubles en agua o alcohol, por lo que este tipo de disolventes son ampliamente utilizados al momento preparar extractos con fines de análisis (28).

La distribución de algunos de los compuestos anteriormente mencionados en el propóleo es: triterpenos en 50%, ceras en un 25-30%, sequiterpenos volátiles en un 8-12%, resinas y compuestos fenólicos en un 5-10% (1,23). Por otro lado, se han reportado múltiples terpenos y flavonoides de importancia (19), los cuales se muestran en la Tabla 4.

En cuanto al contenido mineral se ha identificado la presencia de algunos componentes traza de calcio, potasio, magnesio, aluminio, boro, cromo, hierro, manganeso, níquel, estroncio y zinc, también algunos elementos tóxicos como arsénico; cadmio; mercurio y plomo (29).

2.1.3.4 Composición de la jalea real

La jalea real es una secreción espesa y lechosa, producida por las mucosas glandulares hipo faríngeas y mandibulares de las abejas que sirve como alimento de las larvas (30). La abeja reina es alimentada con jalea real durante todo su período larvario, de ahí su nombre

de “jalea real” (31). Tiene una densidad de 1.1g/ml, su color es blanquecino a amarillo, su olor es picante y es de sabor amargo y dulce. Su viscosidad varía según el contenido de agua, el tiempo de almacenamiento, para mantener sus propiedades debe estar en congelación o en refrigeración a 5°C, es parcialmente soluble en agua y su pH puede variar desde 3.4-4.5 (32).

La jalea real en fresco contiene 50-70% de agua, un 9-18% de proteínas, 7-18% de carbohidratos, 3-8% de lípidos, 1.5% de sales minerales y pequeñas cantidades de polifenoles y vitaminas. El producto liofilizado contiene <5% de agua, 27-41% de proteína, un 22-31% de carbohidratos y 15-30% de grasa (33).

Los azúcares más relevantes que contiene son fructosa y glucosa (34), aunque también se pueden encontrar algunos oligosacáridos tales como: trehalosa, maltosa, isomaltosa, rafinosa, erlosa y melezitosa (33). En cuanto a las proteínas el 80% son solubles (35), las cuales son principalmente extraídas eficazmente por técnicas de centrifugación por HPLC, en donde se han podido identificar diversos aminoácidos como alanina, leucina, fenilalanina, serina, lisina, arginina, tirosina, asparagina, ácido glutámico, prolina e isoleucina (36).

Los lípidos contenidos en la jalea real están representados por un 80-85% de ácidos grasos, 4-10% de fenoles, 5-6% de ceras, 3-4% de esteroides y 0.4-0.8% de fosfolípidos. De los ácidos grasos, el 32% está representado por el ácido graso trans: 10-hidroxi-2-decenoico (37).

Entre los elementos minerales de importancia están el potasio, sodio, magnesio, zinc, hierro, cobre y manganeso (38).

2.1.4 Propiedades de los alimentos vinculadas a su empleo

La obtención de una nutrición óptima mediante la utilización de alimentos funcionales tiene como finalidad optimizar las funciones fisiológicas de cada persona para asegurar el máximo de bienestar, salud y calidad de vida (39). Los cambiantes estilos de vida y hábitos alimentarios, generan nuevas necesidades en los individuos, pues los consumidores están cada vez más conscientes de su autocuidado, y buscan en el mercado productos que contribuyan a su salud y bienestar (40).

2.1.4.1 Propiedades nutricionales y funcionales

Las propiedades nutricionales hacen referencia a la capacidad de contribuir al aporte de nutrientes, cuyas estructuradas son necesarias para el organismo para llevar a cabo funciones vitales. Por su lado, las propiedades funcionales se definen como aquellas en las que, al margen del carácter nutritivo, determinan el comportamiento del alimento en cuanto al conjunto de sustancias integradas en sistemas fisicoquímicos, cada uno de los cuales desempeña una función relacionada con la salud (41).

En este contexto, han aparecido gran variedad de vocablos relacionados como lo son los alimentos de diseño o alimentos diseñados, nutracéuticos, y alimentos funcionales, fármacos nutrientes, entre otros.

2.1.4.2 Alimentos funcionales y alimentos de diseño

El término alimento funcional nació en Japón en 1980, posteriormente, han aparecido en todo el mundo una variedad de vocablos más o menos relacionados con los “alimentos de uso específico para la salud” (Foods for Specific Health Use; FOSHU), dentro de ellos, hay términos más exóticos, como alimentos nutracéuticos, alimentos diseñados o alimentos de diseño, farmalimentos, medicalimentos y vitamina-alimentos y otros más tradicionales, como suplementos alimentarios y alimentos enriquecidos (39). En el año 2004, la American Dietetic Association (ADA), emitió un documento institucional sobre los alimentos funcionales, donde los definen como *“aquellos que tienen potenciales efectos beneficiosos comprobables sobre la salud cuando son consumidos como parte de una dieta variada, a niveles efectivos”* (40).

Es así como los alimentos de diseño, son definidos como *“alimentos tradicionales modificados que aportan beneficios para la salud en comparación con los productos no modificados, el cual puede ser consumido como parte de una dieta diaria y presentado en apariencia similar al alimento base”* (42).

En base a lo mencionado anteriormente, la miel en combinación con otros productos de la colmena se convertiría en un alimento de diseño apto para su consumo habitual, aportando beneficios a la salud a partir de sus características intrínsecas.

2.2 Antecedentes de problema

2.2.1 Beneficios del consumo de los productos de la colmena en la salud humana

Desde la antigüedad el interés por las abejas surgió a partir de su capacidad para producir miel y otros productos que derivan de las secreciones de las glándulas de las abejas, éstas incluyen jalea real, cera, polen, propóleo, a los cuales se les han designado numerosos efectos beneficiosos en la salud humana (1).

Existen numerosas evidencias del uso de la miel en la salud como remedio medicinal, desde civilizaciones egipcias, griegas, y chinas hecho que le confiere ser objeto de múltiples investigaciones (43)

El uso de la miel como alimento o como remedio medicinal, por los humanos data desde tiempos inmemorables (44) su popularidad ha ido creciendo, al grado de convertirse objeto de múltiples investigaciones, con la finalidad de evaluar las propiedades biológicas de la miel y sus productos derivados para el control de algunas enfermedades crónicas o como auxiliar en el tratamiento de las mismas (45), a partir de su capacidad antioxidante, antiinflamatoria, anticancerosa, cardioprotectora (46), de tal forma resulta importante dar a conocer las investigaciones más sobresalientes para la miel, jalea real, polen y propóleo.

2.2.1.1 Efecto terapéutico en el cáncer

El beneficio de los productos de la colmena en el cáncer ha sido evidenciado en diversos escritos, sin embargo, uno de los más recientes, constituye uno efectuado en 2016, en células (C26), el cual tuvo como finalidad verificar las actividades farmacológicas *in vitro* de la administración del polen en células tumorales, donde se encontró que el polen en extracto tiene un agente antitumoral, derivado de sus agentes bioactivos (47).

2.2.1.2 Efecto terapéutico en las enfermedades crónico degenerativas

Es bien sabido que la diabetes produce alteraciones orgánicas a diferentes niveles, de tal forma que se ha probado el uso de la miel como auxiliar terapéutico, por citar algunos, se distingue un análisis efectuado en 24 ratas Sprague-Dawley, el cual tenía como objetivo evaluar el efecto hipoglucémico de la miel como un factor protector contra el estrés oxidativo, para lo cual, se dividieron los animales en 4 grupos (ratas sanas, ratas con administración de

1g/kg/día de miel, ratas diabetizadas y ratas diabetizadas más la administración de miel (1g/kg/día), con una duración de 4 semanas, en el cual se observó que el grupo de ratas diabéticas con la administración de miel tuvo aumento de los niveles de malonaldehído, mayor regulación de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (48). La disfunción hepática causada por las elevaciones de las transaminasas y la fosfatasa alcalina, se considera una alteración común a consecuencia de la diabetes, tal como lo expuesto en un estudio efectuado en un modelo animal de ratas macho Sprague-Dawley, el cual pretendía evaluar el efecto de la administración de miel y su efecto en la reducción de los biomarcadores para el diagnóstico de disfunción hepática, los animales se organizaron en 4 grupos; proporcionando evidencia de que la administración de miel a dosis de 1g/kg/día en ratas durante 4 semanas, pudiera resultar ser un potencial hepatoprotector en la diabetes (49).

Otra evidencia, en cuanto a los beneficios de la miel y sus productos derivados, para el control o tratamiento de la diabetes, sobresale un ensayo clínico aleatorizado, en el 2015, el cual tuvo como propósito evaluar el efecto de una dosis única de jalea real fresca, como terapia complementaria sobre la respuesta glucémica en pacientes con diabetes tipo 2, con la participación de 40 pacientes organizados en 2 grupos, uno con administración de jalea real y uno placebo, se encontraron diferencias entre los grupos para insulina, péptido C (50).

Por el contrario, para el mismo año se encuentra otra evidencia a partir de un ensayo clínico, el cual valora los beneficios de la jalea real en la diabetes, donde participaron 46 pacientes diagnosticados con diabetes tipo 2, organizados en un grupo placebo y otro con la administración de jalea real, evaluaron el efecto de la ingesta de jalea real durante 8 semanas a dosis de 1000 mg, 3 veces al día; y se concluyó que la jalea real pudiera tener efectos sobre el mejoramiento de la resistencia a la insulina (51).

Abdulrhman y colaboradores en 2013, determinaron el efecto del consumo de miel sobre los niveles séricos de glucosa y péptido C en pacientes con diabetes tipo 1; se trató de un estudio de casos y controles de 50 pacientes con la patología y 30 controles, a los cuales se les determinó la curva de tolerancia a la glucosa después de la ingesta de miel, sucralosa, y glucosa, posterior a la administración, así como los niveles del péptido C, se pudo concluir que la miel genera un aumento en este indicador, en comparación con la sucralosa y glucosa, hecho que le confiere establecer un posible efecto regenerador de la miel sobre las células

beta dañadas, considerándose así como un objeto de investigaciones dirigidas a determinar la eficacia de dicho hallazgo (52).

Se ha informado que el polen de abeja evita la osteoporosis aumentando la masa ósea y exhibe además una acción antialérgica, este mecanismo se evaluó en ratas Wistar en 2007, a las cuales se les administró 5,10, o 20 mg de polen disuelto, durante 14 días, las pruebas concluyeron que el polen provocó una reducción de peso, contribuyó además en la reducción de los niveles de glucosa sérica, triglicéridos, así mismo los niveles de calcio se vieron incrementados, y los niveles de fósforo aumentaron significativamente después de la administración del polen en extracto (53).

Con respecto al uso terapéutico de la jalea real, se valoró en un estudio a partir de la suplementación de jalea real y su efecto en el metabolismo de las lipoproteínas séricas, en el cual participaron un total de 15 adultos sanos voluntarios de 36 a 48 años de edad, distribuidos en dos grupos: uno al que se le administró 6 g de jalea real y uno control, el cual no tuvo administración de algún compuesto, tuvo una duración de 4 semanas, encontrando una reducción significativa del colesterol LDL (54).

La evidencia de jalea real también se extiende a su utilización como auxiliar en el control de la glucosa, así como el mejoramiento de otros parámetros bioquímicos tal como se plantea en un escrito publicado en 2012, el cual constó de 61 voluntarios sanos, de 42-83 años de edad, distribuidos en 2 grupos formados: uno control con placebo y otro intervenido, a este último se le administró 100 mL de líquido que contenía 3000 mg de jalea real y el grupo de placebo recibió un líquido de apariencia similar, pero sin jalea real. La intervención tuvo una duración de 6 meses. En cuanto a los resultados encontrados, éste concluyó que la ingestión de jalea real resulta beneficiosa para mejorar la eritropoyesis, y resistencia a la glucosa (55).

Asimismo, se ha observado que la administración de propóleo encapsulado proporciona efectos terapéuticos en el control glucémico, resistencia a la insulina y trastornos del metabolismo de proteínas en ratas, durante 10 semanas, deduciendo que el propóleo pudiera resultar un auxiliar terapéutico para el tratamiento de estas afecciones (56).

También se ha encontrado que los polifenoles del propóleo presentan propiedades cardio protectoras, ello se informó en el año de 2008 en ratas Wistar, con una duración de 15 días, en donde los antioxidantes del propóleo proporcionan protección cardiovascular después de la administración de doxorrubicina (57).

Adicionalmente, se ha analizado el efecto terapéutico de la administración de miel en 55 pacientes con sobrepeso u obesidad, organizados en 2 grupos, al grupo control se le administró 70 g de sacarosa y al otro 70 g de miel durante 30 días, se encontró que la ingesta de miel mejora los niveles de colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL y glucosa sérica en ayunas (58). Otra publicación de 2011 ofrece evidencia sobre el uso de propóleo en la salud, aplicado en un modelo animal de ratas Sprague-Dawley, el cual pretendía analizar el beneficio de su ingesta como auxiliar terapéutico en la diabetes, para lo cual las ratas fueron distribuidas en 2 grupos (propóleo chino y brasileño), las cuales recibieron una dosis de 10 mg/kg en extracto, posterior a la intervención se dedujo que el grupo tratado con propóleo chino, mostró una reducción del 8.4% de los niveles de hemoglobina glucosilada, una mejora del estrés oxidativo en sangre, hígado y riñón para ambos grupos, y además una evidente reducción en los niveles de transaminasas (59).

2.2.1.3 Efecto terapéutico en enfermedades inflamatorias

Se ha planteado que la jalea real proporciona efectos antiinflamatorios, atribuidos a sus efectos antioxidantes y antiradicales (60), de ahí se derivan algunos que han observado estos mecanismos en diferentes afecciones, entre ellas sobresale uno de 2016, el cual tuvo como propósito determinar si sus compuestos bioactivos resultaban beneficiosos para tratar la hiperplasia benigna prostática, a través de la reducción de los niveles del antígeno prostático, así como los síntomas asociados, la investigación se realizó en 40 pacientes y sin grupo control, los cuales recibieron una dosis única diaria de 38 mg de jalea real fresca congelada durante un período de 3 meses, los resultados apuntaron a que la jalea real confiere efectos positivos sobre la calidad de vida en pacientes con hiperplasia prostática benigna, sin efectos secundarios (61).

Otra publicación similar, pero en un modelo en ratas (organizadas en 5 grupos de 7, con grupo control), con inflamación renal inducida por etilenglicol, el cual planteó evaluar el impacto de la jalea real en la reducción de factores inflamatorios (citoquinas pro

inflamatorias, anti inflamatorias, factor de necrosis tumoral), a través de la administración de la jalea real por sonda durante 2 semanas, encontrando que la jalea real pudiera resultar un auxiliar en la disminución de la inflamación en la urolitiasis renal (60).

En el año 2011, una investigación en 28 ratas Wistar macho, organizadas en 4 grupos de 7 integrantes cada uno, tuvo como objetivo evaluar el efecto antiinflamatorio del polen de abeja en ratas con edema inducido por carrageninas, e investigar el mecanismo de la acción del polen, finalmente, determinaron que el polen preparado en extracto resulta un potencial anti-inflamatorio con actividad inhibidora de la COX-2, por lo que el polen pudiera ser beneficioso no sólo como un suplemento dietético y sino como un alimento funcional (62).

2.2.1.4 Otros efectos benéficos a la salud

El efecto estrogénico de los ácidos grasos en la jalea real (ácido 10-hidroxi-2-decenoico), se analizó en 2007, al determinar que sus compuestos podrían estar atribuidos a efectos farmacológicos similares para la mejora de los síntomas de la menopausia, formación de densidad ósea, prevención de osteoporosis (63).

Por otro lado, en año 2009, se evidenció el uso clínico de la jalea real en futbolistas con fines ergogénicos, el número total de participantes fue de 25 futbolistas de 12 años que entrenaban 4 días por semana, se distribuyeron en 2 grupos: el grupo experimental, tomó la jalea real 5 días por semana, durante 2 meses y un grupo control, a través de la intervención se dedujo que la jalea real contribuyó al aumento de la estatura, incremento del músculo, decremento en el porcentaje de grasa corporal, y aumento de la circunferencia de pierna (64).

2.3 Planteamiento del problema

Los alimentos funcionales, no se consideran tratamientos de primera línea para el manejo de las enfermedades, sin embargo, pueden contemplarse como valiosos auxiliares terapéuticos, a partir de sus propiedades fisicoquímicas bien definidas basados en múltiples evidencias científicas.

Los productos de la colmena, nombre que reciben todos los alimentos que producen la abeja del género *Apis mellífera L*, incluyendo miel, jalea real, polen y propóleo, son considerados una buena fuente de nutrientes tales como, vitaminas, antioxidantes, minerales,

azúcares, aminoácidos y ácidos grasos (1,14,25–34,15,35–39,17–22,24), por lo que con el motivo de aprovechar estas propiedades, las investigaciones se han enfocado en determinar con precisión el proceso terapéutico que aportan a los individuos, derivado de lo anterior, la caracterización previa resulta ser primordial para la preparación de las muestras, partiendo de métodos estandarizados, para a su vez conocer las variabilidades botánicas, producidas por factores externos como el clima, floración, estaciones del año, y ello a su vez, determinará el valor nutrimental y funcional de los productos de la colmena.

Por otro lado, en la actualidad la mayoría de las evidencias existentes acerca de los productos de la colmena, señalan las propiedades terapéuticas por separado, es decir solo evalúan un producto de la colmena (47,48,60–64,50,53–59) y no a partir de la combinación es este caso de 4 productos de la colmena: miel, jalea real, polen y propóleo.

A su vez, en otras investigaciones, sólo han evaluado las características físicas, químicas y funcionales, algunos con la finalidad de aislar compuestos bioactivos, otros solo para determinarlos (16,20,23,25–28,36), con la finalidad de elaborar complementos nutricionales en forma de cápsulas o pastillas.

El producto desarrollado, consta de una mezcla inocua, caracterizada de miel, jalea real, polen y propóleo, el cual aportará hidratos de carbono, proteína, grasas, minerales, antioxidantes y capacidad antioxidante.

III. JUSTIFICACIÓN

Como es sabido, una alimentación variada con buenas cantidades de macro y micronutrientes resulta prometedor en la salud humana, para la prevención, control y tratamiento de diversas patologías, por ello constantemente los individuos recurren a “productos milagro”, los cuales aseguran curar o erradicar varios padecimientos; sin embargo, estos carecen de sustento científico, de pruebas de seguridad de los compuestos que los integran, y en algunas ocasiones se enmascaran algunos ingredientes o se desconoce la naturaleza completa de los elementos que lo integran.

Los alimentos de diseño formulados a partir de un alimento con un nivel bajo de procesamiento se consideran mucho más seguros, ya que además de aportar nutrientes, son formulados a partir de procesos experimentales controlados, cuentan además con una caracterización previa de sus atributos, y existe evidencia científica de sus propiedades terapéuticas para uno o más padecimientos.

La apicultura, es una actividad económica ampliamente practicada en el estado de Hidalgo. Debido a lo cual los apicultores hidalguenses originarios de diversos sectores de la población, se han esforzado por impulsar el consumo de los productos de la colmena, ofreciéndolos con el supuesto empírico de aportar beneficios terapéuticos a la salud. Por consiguiente, debido a que no existen evidencias científicas acerca de la elaboración de alimentos de diseño con capacidad antioxidante, a partir de una mezcla de miel, jalea real, polen y propóleo, resulta importante distinguir el presente trabajo, en primera instancia al ofrecer un producto de valor agregado, a partir de sus componentes nutricionales y funcionales, posteriormente, al fomentar el desarrollo económico en los sectores de la población hidalguense que se dedique a la apicultura, finalmente, a la población en general derivado de las beneficios que le aportaría y la industria alimentaria, al originar un producto innovador, que pudiera en un futuro ofrecerse en el mercado o ser objeto de investigaciones posteriores.

IV. HIPÓTESIS

La formulación de un alimento de diseño, a base de miel, jalea real, polen y propóleo, contendrá compuestos y propiedades antioxidantes en condiciones estandarizadas.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Efectuar la caracterización fisicoquímica y funcional de miel, jalea real, polen y propóleo, obtenida de un apiario del municipio de Tulancingo, Hidalgo, mediante técnicas establecidas para la elaboración de un alimento de diseño con propiedades antioxidantes y potencial terapéutico en la salud humana

5.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar las características físico-químicas de las muestras de miel, jalea real, polen y propóleo de Tulancingo, Hidalgo, para conocer sus propiedades nutricionales
- 2) Analizar microbiológicamente las muestras de miel, jalea real, polen y propóleo de Tulancingo Hidalgo, para conocer su inocuidad
- 3) Evaluar la proporción de antioxidantes, actividad antioxidante y actividad quelante de las muestras de Tulancingo, Hidalgo y comparar con muestras de Mérida, para establecer sus propiedades funcionales
- 4) Diseñar seis formulaciones de alimento de diseño, para realizar prueba de aceptación mediante una evaluación sensorial
- 5) Caracterizar el producto final, mediante la determinación de antioxidantes, actividad antioxidante, análisis microbiológico, para conocer sus propiedades funcionales e inocuidad, y establecer su potencial para ser utilizado en la salud humana

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Tipo de estudio

Se trata de un estudio experimental.

6.2 Diagrama del diseño experimental

De acuerdo a lo descrito en la Figura 2 y 3, el proyecto fue realizado en 2 fases, la primera consistió en la obtención de las muestras, su caracterización en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas y funcionales y los ensayos de formulación previo a la evaluación sensorial, posteriormente en una segunda etapa se caracterizó el alimento de diseño a partir del análisis de sus propiedades fisicoquímicas, funcionales y microbiológicas.

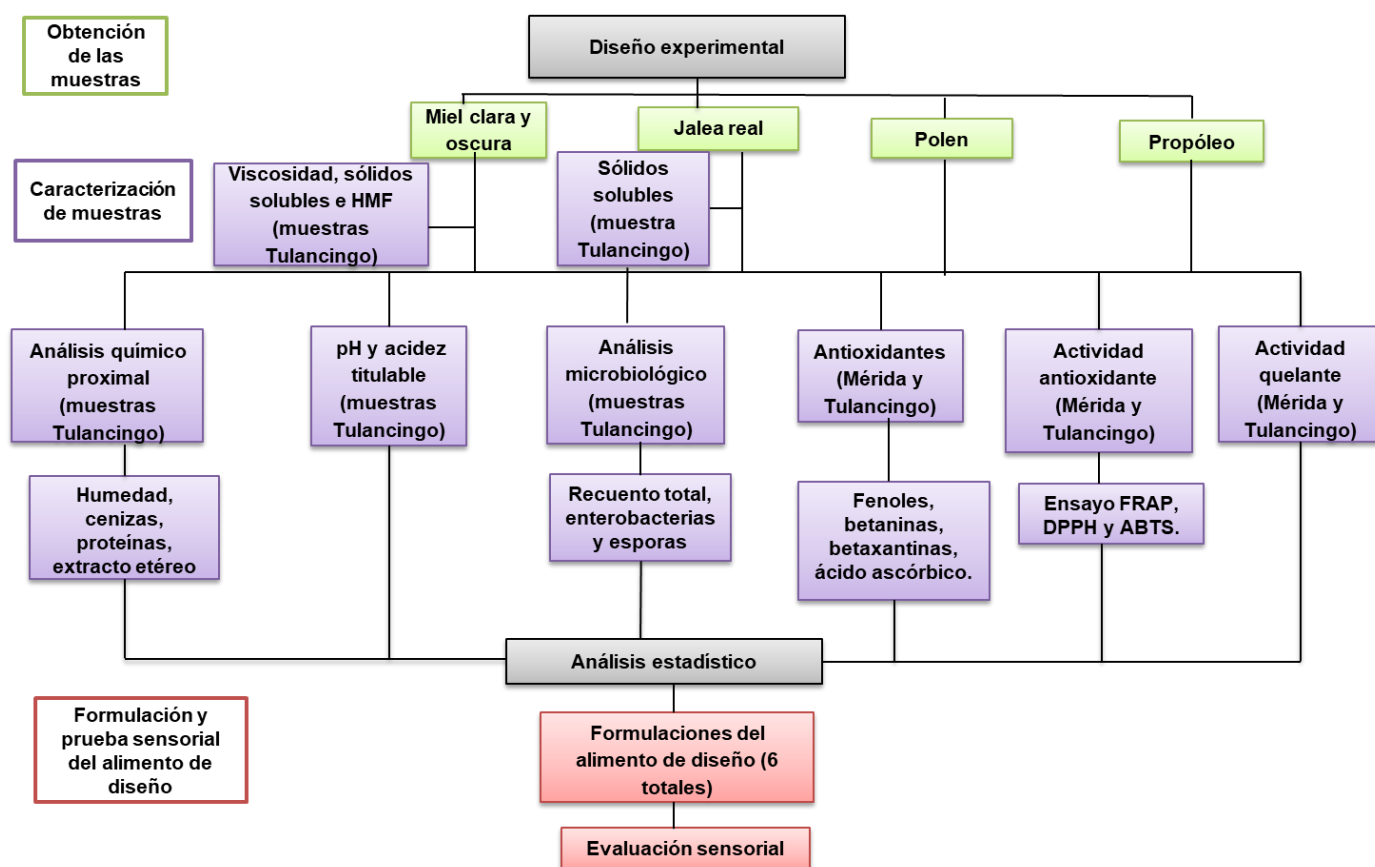


Figura 2. Diseño experimental parte 1.

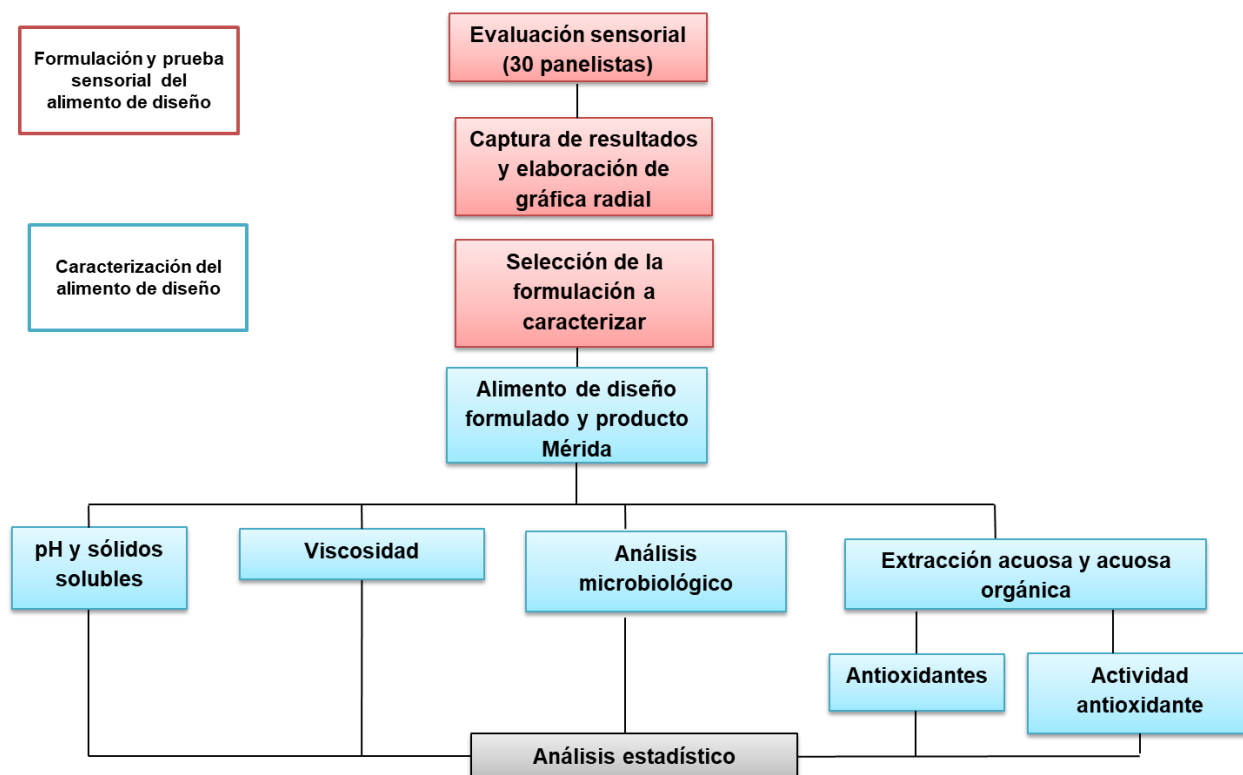


Figura 3. Diseño experimental parte 2.

6.3 Obtención de la muestra

Las muestras de miel, polen, jalea real y propóleo fueron proporcionadas por el apicultor Hugo Narciso León, productor apiario de la marca “ANIHU”, provenientes del municipio de Tulancingo, Hidalgo.

La jalea real durante su traslado se mantuvo en hielo para mantener la temperatura de congelamiento y evitar alteraciones en sus componentes, posteriormente la muestra se mantuvo en congelamiento a -30°C , al igual el propóleo. El resto de las muestras (miel y polen) se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su utilización.

6.4 Análisis químico proximal

6.4.1 Determinación de % Humedad

6.4.1.1 Principio

Se basa en un método de secado, en el cual se lleva a cabo la determinación de la pérdida de peso a causa de la evaporación del agua durante el punto de ebullición o temperaturas cercanas a él, se trata de un método gravimétrico, en el cual se determina la diferencia de pesos de las muestras antes y después de secarla a una temperatura constante (67).

6.4.1.2 Procedimiento

Se determinó en las muestras de Tulancingo y de acuerdo al método de la “Association of Official Analytical Chemist (AOAC) (método 925.09; AOAC 2005), empleando un horno de secado (Scorpion Scientific, A52035, EUA), el cual consiste en tomar 1 g de muestra a peso constante a 105°C durante 4h, posteriormente se enfría en desecador, durante 30 minutos. El porcentaje de humedad se cuantificó por diferencia de peso empleando una balanza analítica (Adventurer, AR 1140, China) (68), utilizando la siguiente ecuación:

Ecuación 1. Porcentaje de humedad.

$$\% \text{ Humedad} = \left(\frac{P_i - P_f}{P_i} \right) * 100$$

Dónde:

P_i=peso inicial de la muestra humedad

P_f=peso final de la muestra seca

6.4.2 Determinación % Cenizas

6.4.2.1 Principio

La determinación de cenizas se considera un criterio útil para la identificación autenticidad de un alimento ya que se pueden detectar adulterantes, es un método que consiste en llevar la muestra a carbonización para después incinerarla. El resultado se obtiene por diferencia de pesos (67).

6.4.2.2 Procedimiento

Se estudió en las muestras de Tulancingo y se realizó por el método de incineración, propuesto por la AOAC (Método 923.03; AOAC 2005), empleando una mufla (Thermolyne F1500, EUA), el cual consiste en pesar 5 g de muestra en un crisol de porcelana, posteriormente es llevada a carbonización con un mechero de bunsen, para después incinerarla en una mufla a 525 °C durante 5 horas como mínimo según el tipo de muestra, al término se disminuye temperatura a 200°C, se pasan a un desecador 30 minutos y por último se determina el porcentaje por diferencia de peso empleando una balanza analítica (68). Los cálculos se obtuvieron con la siguiente ecuación.

Ecuación 2. Porcentaje de cenizas.

$$\% \text{ De cenizas} = \left(\frac{A - B}{C} \right) * 100$$

Dónde:

A= peso del crisol a peso constante con muestra seca (g)

B= peso del crisol con ceniza (g)

C= peso de la muestra seca (g)

6.4.3 Determinación de % Proteínas

6.4.3.1 Principio

Existen diversos métodos para conocer el contenido de proteínas en un alimento, sin embargo, el método de Kjeldhal se considera la técnica más confiable, la cual se basa en la digestión de la muestra para reducir el nitrógeno orgánico hasta amoníaco, una vez concluida la digestión, se alcaliniza, se destila y se titula, finalmente el resultado final es el porcentaje de nitrógeno (67).

6.4.3.2 Procedimiento

Se analizó en las muestras de Tulancingo, según el método oficial de la AOAC 991.20 (2005), adaptado al equipo de digestión, destilación y neutralización (Gerhardt, Vapodest 50) (69) , para el cual se pesaron 0.5g de muestra en un tubo de digestión con una tableta

catalizadora (Kjeltabs CX), 2 mL de agua destilada y 15 ml de H₂SO₄, posteriormente se llevó a digestión, una vez que el digestor alcanzó 230°C, se elevó a 260°C 5 minutos, 300°C por 10 minutos, 400°C por 20 minutos y finalmente 405°C, hasta observar un tono verde esmeralda, finalmente, se llevó al destilador adicionando NaOH al 32%, luego se tituló automáticamente con ácido bórico al 3%, obteniendo entonces, un porcentaje de nitrógeno el cual para ser calculado se realizó la aplicación de la siguiente fórmula.

Ecuación 3. Porcentaje de proteína total.

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ de Nitrógeno} * \text{Factor de corrección}$$

Dónde:

Factor de corrección= 5.6 para la muestra de polen y de 6.25 para el resto de las muestras (miel clara, miel oscura, propóleo y jalea real).

6.4.4 Determinación de % Extracto etéreo

6.4.4.1 Principio

La fracción denominada extracto etéreo se obtiene por destilación de una muestra de alimento con un disolvente apolar, como el éter de petróleo en condiciones preestablecidas, en donde se incluyen ceras, alcoholes, pigmentos y ácidos grasos orgánicos. El valor obtenido se considera una buena aproximación del contenido de grasa a los alimentos (70).

6.4.4.2 Procedimiento

Se llevó a cabo de acuerdo a la metodología establecida por la AOAC (930.30; AOAC 2005), utilizando el sistema de extracción de grasas (Buchi, B-811, Suiza). en las muestras de Tulancingo Para el cual se pesó 1 g de muestra en cartuchos de celulosa marca Whatman, se colocaron en vasos de extracción, posteriormente se agregaron 80 mL de éter de petróleo a 30-75 °C, durante 3h, posteriormente se evaporó el éter sobrante, se registró el cambio de peso de los vasos, expresando los resultados en porcentaje y aplicando la siguiente ecuación (68).

Ecuación 4. Porcentaje de extracto etéreo.

$$\% \text{ EE} = \frac{(A - B) * 100}{M}$$

Dónde:

A= peso del vaso con residuo lipídico (g)

B= peso del vaso (g)

M= peso de la muestra (g)

6.4.5 Determinación de pH

6.4.5.1 Principio

Método fundamental para establecer el grado de acidez, neutralidad o alcalinidad en los alimentos ya sean líquidos o semisólidos, el cual mide de forma indirecta la concentración del ión " hidronio", se basa en medir la diferencia de potencial entre un electrodo de vidrio y uno de referencia a través de un aparato de pH (potenciómetro) (71).

6.4.5.2 Procedimiento

Se analizó en las muestras de Tulancingo, utilizando un potenciómetro (Hanna Instruments, 210, EUA). Se utilizó después de su calibración con soluciones buffer de pH 4.0 y 7.0 estandarizados, colocando 1 mL/1 g de la muestra a 10 mL de agua desionizada, finalmente se llevó a cabo la lectura (72).

6.4.6 Acidez titulable

6.4.6.1 Principio

La acidez titulable o normalidad del ácido se determina por titulación o valoración, mediante una base de normalidad conocida, se añade un álcali de normalidad conocida hasta neutralizar la acidez o llevar el pH a punto neutro (73).

6.4.6.2 Procedimiento

Se realizó en las muestras de Tulancingo de acuerdo al método de la AOAC 942.15 (1999), con una solución 0.1 N de NaOH, registrando la cantidad de ml de NaOH utilizada para neutralizar el ácido orgánico que se encuentra en más proporción en las muestras, dando como resultado los miligramos del ácido orgánico presente en la muestra (74). Los resultados se expresaron como mEq de ácido/kg.

6.4.7 Sólidos solubles

6.4.7.1 Principio

Método refractométrico que mide el contenido total de azúcar y sólidos solubles contenidos en un líquido de cualquier viscosidad, la cual se basa en el cambio de dirección que sufren los rayos luminosos en el límite de separación de dos medios, en los cuales es distinta la velocidad de propagación (75).

6.4.7.2 Procedimiento

Fueron determinados en muestras de miel clara, miel oscura, jalea real, alimento de diseño y producto Mérida (comparativo).

Se llevó acabo empleando un refractómetro (Trading Co. Brix/ATC FG-113, Chincan), tomando una alícuota de la muestra y medir las concentraciones, expresando los resultados como °Brix (75).

6.4.8 Hidroximetilfurfural (HMF)

6.4.8.1 Principio

Es uno de los compuestos de importancia en mieles, formado por la degradación de los productos azucarados, en particular por deshidratación de la fructosa. Su aparición, está directamente relacionada con alteraciones de color y el desarrollo de sabores y olores extraños (76).

6.4.8.2 Procedimiento

Se cuantificó en las muestras de miel clara y oscura de Tulancingo y mediante el método establecido por la NMX-F 036-1997. Consistió en preparar una solución de ferrocianuro de potasio (solución de Carrez I) y otra de acetato de zinc (solución de Carrez II), a cada una se le añade 0.5mL de la muestra de miel diluida, posteriormente se midió la absorbancia a 284 nm y 336 nm a través de un lector de microplacas (Power Wave XS 11 UV-Biotek, software KC Junior, EUA) (77). Los resultados se expresaron como miligramos en 100 gramos (mg/100g).

6.4.9 Viscosidad

6.4.9.1 Principio

La fuerza de atracción que mantienen las moléculas a distancias mínimas, dando a las muestras suficiente cohesión determina que éstos al fluir a través de un tubo produzcan fricción. La resistencia que el líquido presenta al flujo se denomina viscosidad (78).

6.4.9.2 Procedimiento

Se evaluó en muestras de miel clara, miel oscura de Tulancingo, así como en el alimento de diseño y producto de Mérida (comparativo), utilizando un viscosímetro rotacional (Broockfield DV3T, EUA), con aguja LV-4 a 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 80 rpm para miel oscura y a 5, 10, 20, 30 y 40 rpm para lo cual la aguja se introdujo en la muestra a analizar, indicando en el viscosímetro las revoluciones por minuto, los resultados se expresaron en centipoises (78).

6.4.10 Análisis microbiológico

6.4.10.1 Principio

Es un procedimiento mediante el cual se determinó la calidad sanitaria e higiénica de la materia prima, así como la forma en que fueron manipulados durante su producción (79)

6.4.10.2 Procedimiento

Fue efectuado en muestras Tulancingo y alimento de diseño, mediante la técnica de vaciado en placa, en donde a partir de una serie de diluciones se inoculó la muestra en los diferentes medios de cultivo: recuento total (RT) y esporas en agar para métodos estándar con una incubación de 48 horas a 30°C (LSI-3016, Labtech, Corea), enterobacterias (EB) en agar billis rojo violeta glucosado (VRBG), con una incubación de 24 horas a 37 °C.

6.4.11 Contenido de antioxidantes

6.4.11.1 Compuestos fenólicos totales

6.4.11.1.1 Principio

Su determinación generalmente se lleva a cabo a través del reactivo Folin Ciocalteu, utilizando un mecanismo de reacción de oxidación/reducción, para medir la capacidad para

reducir el reactivo de ácido fosfomolibdico/fosfotungustico a un complejo azul que es monitoreado espectrofotométricamente (80,81).

6.4.11.1.2 Procedimiento

Se determinaron en muestras Tulancingo, muestras Mérida, alimento de diseño y producto Mérida (comparativo), según el método reportado por Stintzing, utilizando el reactivo Folin Ciocalteu, el cual es reducido a óxidos azules de tungsteno y molibdeno durante la oxidación fenólica. La coloración azul refleja la cantidad total de polifenoles.

Se elaboró una solución con 1 mL de Folin aforando a 10 mL con agua desionizada; solución de carbonato de sodio (7.5 g en 100 mL de agua); solución de ácido gálico (15 mg en 50 mL de agua). Se construyó una curva estándar de ácido gálico con concentraciones de 0,100,200 y 300 mg/L, posteriormente se tomaron 100 µL de muestra de cada una de las muestras, se le adicionó 500µL de Folin y 400µL de carbonato de sodio en viales, se agitaron en vórtex dejando reposar 30 minutos.

absorbancia se midió en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, EUA) a 765 nm (82). Los resultados se expresaron como miligramos de equivalentes de ácido gálico en 100 gramos (mg EAG/100 g).

6.4.11.2 Ácido ascórbico

6.4.11.2.1 Principio

La reducción por espectrofotometría del 2,6 dicloroindofenol (DCPI) es el método más sencillo y fiable para determinar el contenido de ácido ascórbico en alimentos (83).

6.4.11.2.2 Procedimiento

Fue llevado a cabo de acuerdo al método de Dürüst (1997), a través del reactivo 2,6-diclorofenolindofenol (DCPI) que tiene una coloración azul-violeta y al entrar en contacto con el ácido ascórbico se evaluó el cambio de color a rosa o incoloro, en muestras Tulancingo, muestras Mérida, alimento de diseño y producto Mérida (comparativo), de acuerdo con el método

Se preparó una solución de 2,6-Diclorofenolindofenol (DCPI) con 3 mg, diluido en 250 mL de agua desionizada; solución de ácido oxálico (1g), diluido a 250 mL de agua desionizada; solución de ácido ascórbico con 100 mL de la solución de ácido oxálico previamente preparada, finalmente una solución amortiguadora (3g de acetato de sodio aforado con 10 mL de ácido acético glacial y 7 mL de agua desionizada).

Se construyó una curva estándar de ácido ascórbico usando concentraciones de 0,10,20,30,40,50mg/L (ácido ascórbico/agua desionizada). La absorbancia se midió a 520 nm en un lector de microplacas (Power Wave XS 11 UV-Biotek, software KC Junior, EUA) a 5420 nm, los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido ascórbico en 100 gramos (EAC/100g) (84).

6.4.11.3 Betalaínas y betaxantinas

6.4.11.3.1 Principio

Las betalaínas son pigmentos abundantes en la naturaleza, los cuales se dividen en dos grupos: los rojos o betacianinas y los amarillos o betaxantinas. Se les ha atribuido procesos involucrados para la protección contra la oxidación celular debido a su actividad antioxidante (82).

6.4.11.3.2 Procedimiento

El contenido de betalaínas se determinó en muestras Tulancingo, muestras Mérida, alimento de diseño y producto Mérida (comparativo), mediante el método de Stintzing (2005), el cual se basa en la absorción de luz que tienen los pigmentos. La absorbancia se midió en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, EUA) a 535 nm para la cuantificación de betaninas y de 480 nm para betaxantinas, previamente se realizaron pruebas de dilución. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de betaninas en 100g (EB/100g) y miligramos equivalentes de indicaxantinas en 100g (mg EI/100g) (82), después de la aplicación de la siguiente fórmula y la correspondiente conversión a 100 gramos:

Ecuación 5. Determinación del contenido de betalaínas y betaxantinas.

$$\text{mg/L} = \{(A * FD * PM * 1000 / \epsilon * I)\}$$

En donde:

A=Absorbancia a 535 o 480nm

FD=Factor de dilución

PM=Peso molecular

ϵ =Coeficiente de extinción molar

I= Volumen de celda

Coeficiente de extinción molar:

-Betaninas: $\epsilon=6000\text{L}/(\text{mol cm})$. PM=550 g/mol

-Betaxantinas: $\epsilon=48000\text{L}/(\text{mol cm})$. PM= 308 g/mol

6.4.12 Actividad antioxidante

6.4.12.1 Ensayo DPPH^{•+}

6.4.12.1.1 Principio

Se trata de un ensayo basado en la transferencia de electrones, utilizado para la determinación de las propiedades antioxidantes. La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo, es conocida como un radical libre estable, debido a la deslocalización de un electrón se intensifica el color violeta intenso típico del radical. Cuando la solución reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece, y el cambio es monitoreado espectrofotométricamente (85).

6.4.12.1.2 Procedimiento

Se evaluó en muestras Tulancingo, muestras Mérida, alimento de diseño y producto Mérida (comparativo), según la metodología reportada por Morales y Jiménez-Pérez (2001). El reactivo DPPH en solución etanólica presenta una coloración violeta y después de su reducción presenta una decoloración que puede ir hasta amarillo. Se preparó una solución con 7.4 mg de DPPH^{•+} aforando a 100 ml con etanol, utilizando una curva estándar de Trolox

en concentraciones de 0,100,200,300 $\mu\text{mol ET/L}$, posteriormente se tomaron 100 μL de cada muestra y 500 μL de la solución de $\text{DPPH}^{\bullet+}$, se agitó en vórtex y se dejó reposar una hora.

La absorbancia se midió en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, EUA) a 520 nm (86). Los resultados se expresaron como micromol equivalentes de trolox en 100 gramos ($\mu\text{mol ET/100 g}$).

6.4.12.2 Ensayo ABTS $^{\bullet+}$

6.4.12.2.1 Principio

Es un método que monitorea la descomposición del radical catión ABTS producido por la oxidación de 2,2 azinobis (3-etilbenzotiazilina-6-sulfonato) a causa de la adición de una muestra con un compuesto fenólico (87).

6.4.12.2.2 Procedimiento

Se efectuó de acuerdo a Kuskoski (2005), en muestras de Tulancingo, muestras de Mérida, en el alimento de diseño y producto Mérida (comparativo). El ABTS es un radical que presenta un color azul-verde, cuando este catión es reducido por un antioxidante presenta una pérdida de color. En principio, se preparó una solución de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ al 7 mmol (76.8 mg de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ diluido en 20 mL de agua desionizada), se agregó persulfato de potasio al 2.45mMol, (6.6 mg en 10 mL de agua); se dejó reposar por 16 horas, después la mezcla se diluyó en agua hasta obtener una lectura de absorbancia 0.7 ± 0.1 a 754nm. Así mismo, se elaboró una curva estándar con ácido ascórbico. Posteriormente, se tomaron 20 μL de muestra y 980 μL de la dilución de $\text{ABTS}^{\bullet+}$, con un tiempo de reposo de 7 min, tomando una lectura espectrofotométrica a 754 nm en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, EUA) (88). Los resultados se expresaron como micromoles Equivalentes de Ácido Ascórbico en 100 g ($\mu\text{mol EAC/100 g}$).

6.4.12.3 Ensayo FRAP

6.4.12.3.1 Principio

Procedimiento que permite evaluar de forma total el potencial reductor atribuible a las especies antioxidantes presentes basado en la determinación de la concentración final de

los iones Fe^{2+} (ferrosos), formados por reducción de iones Fe^{3+} (ferricos), utilizando ferrocianuro de potasio como sustancia cromógena (89).

6.4.12.3.2 Procedimiento

Se determinó en muestras Tulancingo, muestras Mérida, alimento de diseño y producto Mérida (comparativo) de acuerdo con la metodología de Pérez-Jiménez (2004). El procedimiento se inició preparando el reactivo de FRAP en una concentración 10:1:1 con 100 mL de un amortiguador (0.3 M a pH 3.6), 10 mL de TPTZ (2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina) y 10 mL de Fe Cl_3 . Se elaboró una curva estándar de sulfato ferroso en concentraciones de 0,20,30,40 y 50 μM Fe (II)/L .

Para emplear la técnica se tomaron 30 μL de la muestra, 90 μL y 900 μL de FRAP , la mezcla resultante se pasaron por un vórtex y se dejaron en un baño de agua durante 10 minutos, transcurriendo ese tiempo, se tomó lectura espectrofotométrica a 593 nm, los resultados se expresaron miligramos de Fe^{+2} por 100 gramos (mg Fe (II)/100 g) (90).

6.4.12.4 Actividad quelante

6.4.12.4.1 Principio

Característica que se determina a partir de la medición de la capacidad para generar complejos químicos ante un agente quelante, los cuales suelen ser sustancias con la posibilidad de enlazar iones metálicos polivalentes, con lo que se genera una pérdida de la actividad biológica de los compuestos (91).

6.4.12.4.2 Procedimiento

Fue analizado en muestras Tulancingo, muestras Mérida, alimento de diseño y producto Mérida (comparativo), según Gülcin (2004), el procedimiento se basó en la preparación de una solución quelante, utilizando como agente de referencia EDTA a 0.1M y muestras control agua desionizada. Se colocaron 100 μL de muestra, 50 μL una solución de cloruro férrico y 450 μL de ferrozina, reposando 10 min La absorbancia se midió en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, EUA) a 520 nm (92). Los resultados se expresaron en porcentaje, a través de la siguiente ecuación.

Ecuación 6. Porcentaje de actividad quelante.

$$\% \text{ Actividad quelante} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) * 100$$

Dónde:

A₀= absorbancia de la muestra control

A₁= absorbancia de la muestra

6.4.12.5 Evaluación sensorial

6.4.12.5.1 Principio

Los trabajos sobre el desarrollo de nuevos productos se realizan siguiendo una serie de etapas que es necesario cumplir metódicamente para asegurar un impacto positivo del nuevo producto al llegar al consumidor. Las características sensoriales de los alimentos constituyen el conjunto de estímulos que interactúan con los receptores del analizador (93)

El análisis sensorial es la disciplina científica utilizada para evocar, medir, analizar e interpretar las reacciones a aquellas características de los alimentos y otras sustancias, que son percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído (94).

6.4.12.5.2 Procedimiento

Previo a la evaluación sensorial, se llevaron a cabo ensayos de formulación, un total de 6 identificadas como A1, A2, A3, A4, A5 y A6, de donde cada una de ella cubrió el 15% de la recomendación de antioxidantes, tomando como patrón el contenido de fenoles de cada una de las muestras expresados como mg EAG/100 g (miligramos Equivalentes de Ácido Gálico), de esta manera se realizaron cálculos en gramos de la cantidad a añadir en cada una de las mezclas (Anexo 1-6). Una vez preparadas, se etiquetaron con números al azar cada una de ellas quedando de la siguiente forma: A1= 58, A2=22, A3=05, A4=48, A5=16, A6=90.

La prueba sensorial, se hizo por medio de la aplicación de un cuestionario de prueba de nivel de agrado del producto (Anexo 7 y 8), a 30 panelistas que incluyeron principalmente a profesores investigadores y alumnos de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y público en general, esta prueba determinó el nivel de agrado o desagrado de los atributos de

color, olor, sabor, consistencia y aceptación general, mismos que fueron valorados a través de una escala hedónica de 9 puntos de acuerdo a Ramírez- Navas, 2012, permitiendo así ordenar las muestras, de acuerdo a la magnitud de una sola característica del producto o de acuerdo a la aceptabilidad o preferencia del panelista (95).

Posteriormente, los datos fueron capturados en Excel y a través de los datos obtenidos se realizó una gráfica radial, incluyendo las 6 formulaciones con los códigos numéricos y los puntajes obtenidos para cada una de ellas. Finalmente, la mezcla seleccionada fue aquella en la que se obtuvieron los puntajes promedios más altos.

6.4.12.6 Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados se analizaron mediante estadística descriptiva para expresar los resultados en medias y desviación estándar, análisis de varianza (ANOVA), aplicando la prueba de Tukey para conocer las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras para las determinaciones de análisis químico proximal, pH, sólidos solubles y acidez de los productos de Tulancingo, contenido de antioxidantes y capacidad antioxidante de las muestras de Tulancingo, Mérida, así como las formulaciones y prueba T de Student, para las determinaciones de pH, sólidos solubles del alimento de diseño y del producto Mérida (comparativo) y para el comparativo del HMF de la miel clara y oscura de Tulancingo, a través del paquete estadístico SPSS versión 22.

VII. RESULTADOS

7.1 Análisis químico proximal

En la Tabla 5, se muestran los valores promedios de los parámetros de humedad, cenizas, grasa (extracto etéreo), proteína e hidratos de carbono expresados en porcentaje, de las muestras de miel clara, miel oscura, jalea real, polen y propóleo provenientes de Tulancingo, Hidalgo.

Tabla 5. Resultados de la composición química proximal expresada en porcentaje de miel clara, miel oscura, jalea real, polen y propóleo provenientes de Tulancingo.

Muestra	Humedad	Cenizas	Extracto etéreo	Proteína	Hidratos de carbono
Miel clara	14.18±1.06 ^c	0.29±0.17 ^d	9.62±4.01 ^b	0.35±0.15 ^d	75.81±2.81 ^a
Miel oscura	16.58±1.05 ^b	0.05±0.01 ^d	4.61±0.95 ^c	0.35±0.11 ^d	78.39±0.25 ^a
Jalea real	67.22±0.19 ^a	0.710±0.08 ^c	4.43±0.35 ^c	13.99±0.41 ^b	13.65±0.91 ^d
Polen	13.35±0.05 ^c	1.70±0.11 ^a	7.29±0.57 ^{b, c}	17.26±0.47 ^a	60.21±1.05 ^b
Propóleo	4.40±0.60 ^d	0.98±0.07 ^b	66.68±1.89 ^a	4.63±0.71 ^c	23.29±2.59 ^c

^{a-d} letras superíndices indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras.

Resultados promedio de triplicado y desviación estándar

En el parámetro de humedad los valores oscilaron entre 4.04% y 67.22%, de los cuales la cifra más alta significativamente se encontró en la jalea real, siendo 63.18% ,53.04% y 50.54% mayor en comparación al propóleo, miel clara y miel oscura respectivamente.

En cuanto al porcentaje de cenizas los valores fueron de 0.05% y un máximo de 1.7%, se puede observar que el contenido más alto de cenizas se obtuvo en la muestra de polen ($p < 0.05$), en comparación al resto de las muestras. Por el contrario, las cifras menores se encontraron en las muestras de miel clara y miel oscura.

Para el contenido de grasa (extracto etéreo), se obtuvieron cifras que fluctuaron entre 4.43% y 66.68%, la muestra que presentó más concentración fue el propóleo, con una

proporción 9:1 con respecto al porcentaje obtenido en polen, 15:1 en comparación con miel clara y la jalea real, así como y 14:1 en relación a la miel oscura.

Con respecto al contenido de proteínas, el valor mínimo fue 0.35% y el máximo 17.26%, siendo estadísticamente mayor en el polen ($17.26 \pm 0.47\%$), 49.3 veces mayor respecto a las muestras de miel (clara y oscura).

Finalmente, los hidratos de carbono fueron el componente mayoritario en todas las muestras, se obtuvo un valor mínimo de 13.65% y máximo de 78.39%, (Tabla 5), los valores más altos ($p < 0.05$) se situaron en muestras de miel clara y oscura y los más bajos en el propóleo, en el cual se obtuvo el triple al compararlo con las muestras de miel (clara y oscura).

7.2 pH, sólidos solubles totales y acidez

Las propiedades químicas (pH, sólidos solubles y acidez) de miel clara, miel oscura, polen y propóleo de Tulancingo, Hidalgo se pueden apreciar en la Tabla 6.

Para el parámetro de pH, los valores significativamente más altos ($p < 0.05$), corresponden a la muestra de propóleo y miel clara. En contraste, para el resto de las muestras sin diferencia significativa.

El contenido de sólidos solubles totales, únicamente se determinó en muestras de miel clara, miel oscura y jalea real. Los valores para este parámetro se muestran en la Tabla 6. La proporción de sólidos solubles más alta ($p < 0.05$) correspondió a la miel clara, la cual al compararla con la jalea real resultó ser 236% mayor.

Finalmente, para acidez, se puede apreciar que el valor significativamente más alto ($p < 0.05$) se identificó en el polen (803.33 ± 15.27 mEq/kg), el cual fue 38.25 y 28.35 veces superior respecto a la miel clara y oscura, respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados de pH, sólidos solubles totales y acidez de miel clara, miel oscura, jalea real, polen y propóleo, provenientes de Tulancingo, Hidalgo.

Producto de la colmena	pH	Sólidos solubles (°Brix)	Acidez (mEq/kg)
Polen	3.85±0.034 ^b	-----	803.33±15.27 ^a
Propóleo	4.16±0.005 ^a	-----	143.33±5.77 ^b
Miel clara	4.05±0.040 ^a	86.00±0.00 ^a	21.00±1.73 ^d
Miel oscura	3.82±0.005 ^b	84.00±0.00 ^b	28.33±2.88 ^d
Jalea real	3.81±0.000 ^b	36.33±0.57 ^c	121.66±2.88 ^c

^{a-d} Letras superíndices indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras. Resultados promedio de triplicado y desviación estándar.

7.3 Hidroximetilfurfural (HMF)

La medición del HMF se llevó a cabo en las muestras de miel oscura y miel clara, provenientes de Tulancingo, Hidalgo, esto con la finalidad de determinar el grado de antigüedad de las mieles a utilizar para formular el alimento de diseño expresadas como mg/100 g de muestra. En la Tabla 7, se pueden observar sus valores promedio, en donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre ambas muestras.

Tabla 7. Resultados de Hidroximetilfurfural (HMF) de miel clara y miel oscura, provenientes de Tulancingo, Hidalgo.

Producto de la colmena	HMF (mg/100g)
Miel clara Tulancingo	2.04±0.25
Miel oscura Tulancingo	2.19±0.37

Sin diferencia significativa entre las muestras ($p > 0.05$). Resultados promedio de triplicado y desviación estándar.

7.4 Viscosidad

Como se puede observar en la figura 4, las muestras de miel clara y oscura presentaron un comportamiento pseudoplástico, ya que se aprecia una disminución de la viscosidad conforme aumenta la velocidad de corte (rpm).

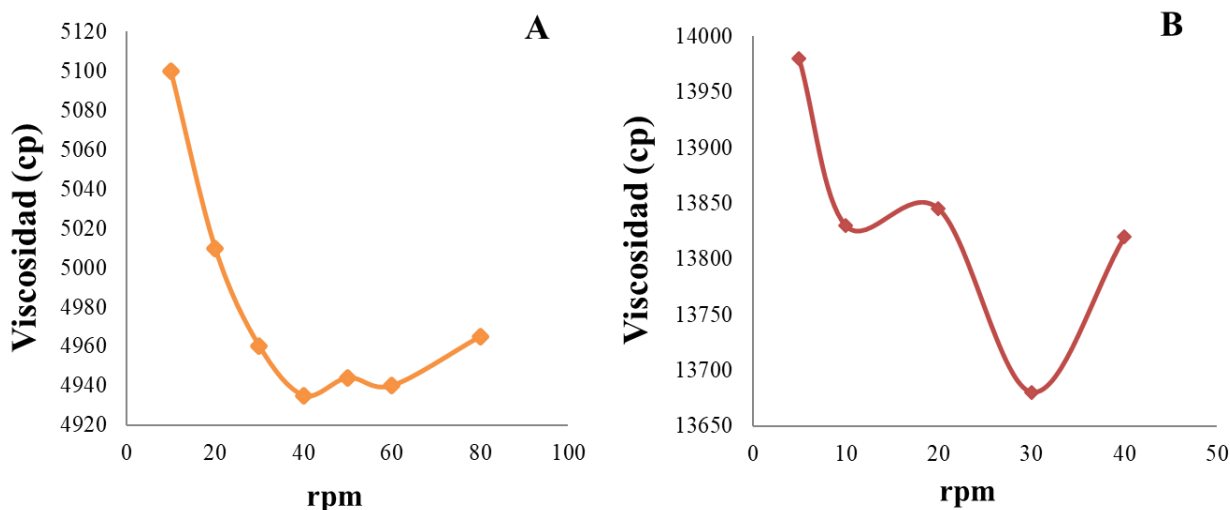


Figura 4. Cinética de viscosidad de la miel a temperatura ambiente. Resultados promedio de 3 réplicas. A. Viscosidad de miel oscura. B. Viscosidad de la miel clara.

7.5 Análisis microbiológico

Con la finalidad de evaluar inocuidad de las muestras procedentes de Tulancingo, Hidalgo, se llevó a cabo el análisis microbiológico, a través del recuento de microorganismos de mesófilos aerobios (A), enterobacterias (B) y esporas (C). En donde, para A, no se detectaron colonias en las muestras de miel clara, miel oscura, jalea real y propóleo. Únicamente se detectaron en el polen con $1.95 \pm 0.24 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/g}$. Para B, en ninguna de las muestras se encontraron colonias. Por último, para C, únicamente se cuantificaron en las muestras de polen con $1.79 \pm 0.17 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/g}$.

7.6 Contenido de antioxidantes

7.6.1 Betaninas y betaxantinas

Los valores correspondientes a betaninas en las diferentes muestras analizadas se muestran en la Figura 5, los cuales oscilaron entre 0.05 y 19.46 mg EB/100 g. El propóleo de Mérida (PR ME), tuvo los valores significativamente más altos, con $19.46 \pm 1.09 \text{ mg EB/100 g}$, seguido del propóleo originario de Tulancingo (PR TGO) con $8.57 \pm 0.59 \text{ mg EB/100 g}$.

El contenido de betaxantinas se muestran en la Figura 6, en donde el más alto ($p < 0.05$), lo presentó el propóleo de Tulancingo (PR TGO), con $51.59 \pm 1.39 \text{ mg EI/100 g}$, dichos valores fueron 45% más elevado que el propóleo de Mérida (PR ME) y 206% más alto en comparación al contenido polen de Tulancingo (PO TGO).

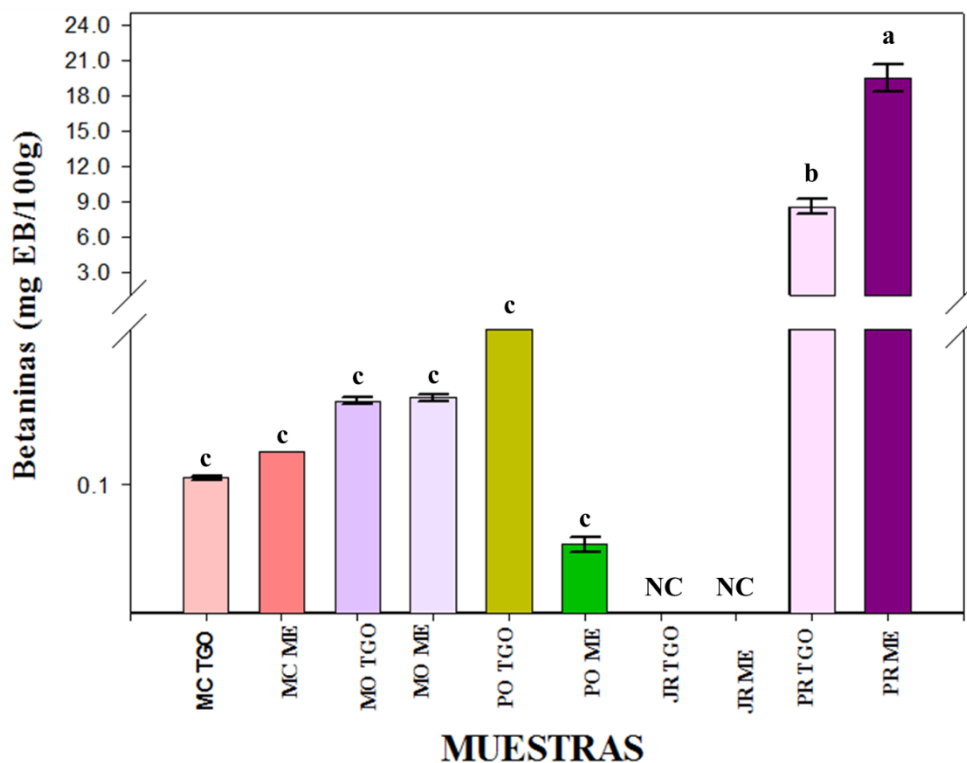


Figura 5. Contenido de betaninas (mg EB/100g) de miel clara, oscura, jalea real, polen y propóleo Tulancingo y Mérida. ^{a-c} Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$). MC TGO=miel clara Tulancingo; MC ME=miel clara Mérida; MO TGO= miel oscura Tulancingo; MO ME= miel oscura Mérida; PO TGO=polen Tulancingo; PO ME=polen Mérida; JR TGO=jalea real Tulancingo; JR ME= jalea real Mérida; PR TGO= propóleo Tulancingo; PR ME= propóleo Mérida; NC= No contiene.

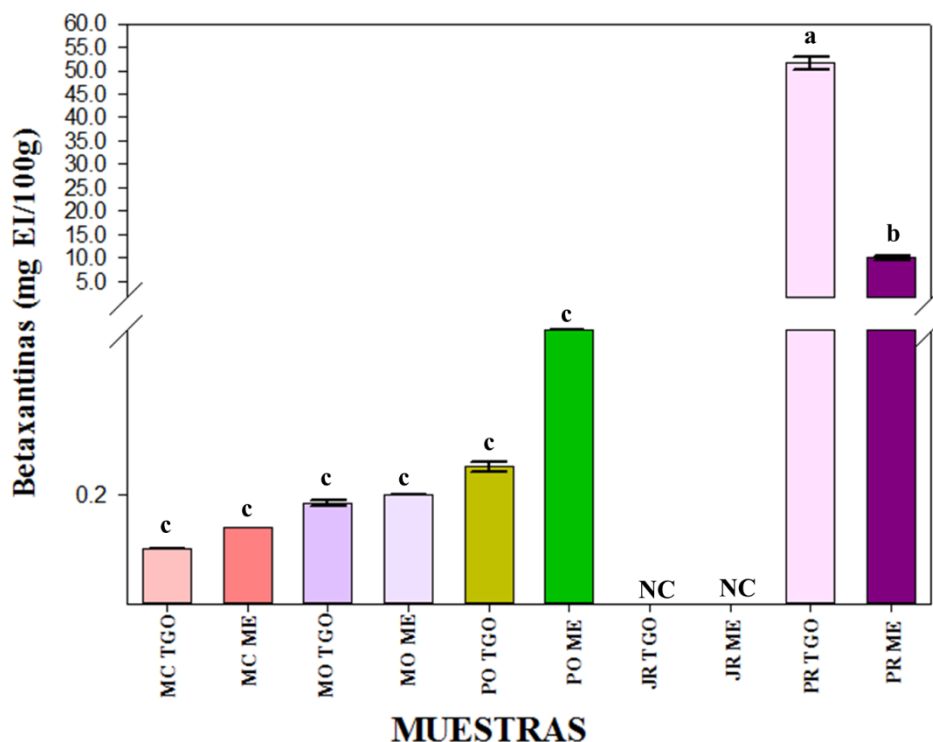


Figura 6. Contenido de betaxantinas (mg EI/100g) de miel clara, oscura, jalea real, polen y propóleo Tulancingo y Mérida. ^{a-c} Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$). MC TGO=miel clara Tulancingo; MC ME=miel clara Mérida; MO TGO= miel oscura Tulancingo; MO ME= miel oscura Mérida; PO TGO=polen Tulancingo; PO ME=polen Mérida; JR TGO=jalea real Tulancingo; JR ME= jalea real Mérida; PR TGO= propóleo Tulancingo; PR ME= propóleo Mérida; NC= No contiene.

7.6.2 Compuestos fenólicos totales

En la Figura 7, se pueden apreciar los valores obtenidos del contenido de fenoles para las muestras de Tulancingo y Mérida, identificando cifras que oscilaron entre 3.55 y 3269 mg EAG/100 g, siendo el propóleo de Tulancingo (PR TGO), al que correspondieron los valores más altos significativamente, comparado al resto de las muestras, de esta forma se evidenció que su contenido está en una relación 921:1 en miel clara de Mérida (MC ME) y 472:1 en comparación a la jalea real de Mérida (JR ME).

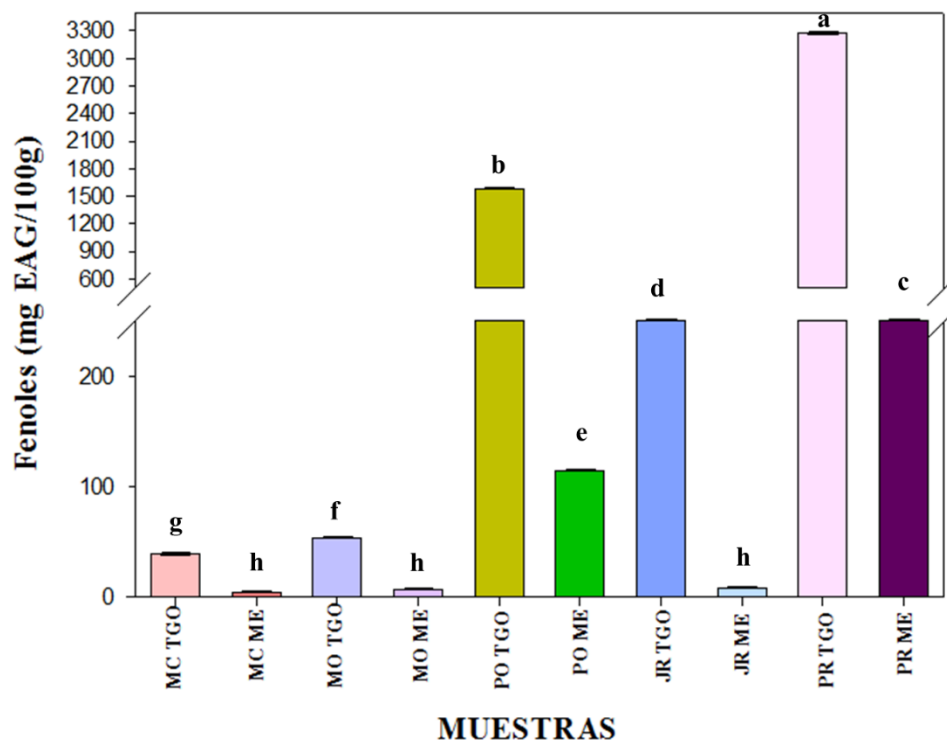


Figura 7. Contenido de fenoles (mg EAG/100g) de alimento de diseño y producto Mérida. ^{a-h} Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$). MC TGO=miel clara Tulancingo; MC ME=miel clara Mérida; MO TGO= miel oscura Tulancingo; MO ME= miel oscura Mérida; PO TGO=polen Tulancingo; PO ME=polen Mérida; JR TGO=jalea real Tulancingo; JR ME= jalea real Mérida; PR TGO= propóleo Tulancingo; PR ME= propóleo Mérida.

7.6.3 Contenido de ácido ascórbico

El contenido de ácido ascórbico para cada una de las muestras de los productos de la colmena se detalla en la Figura 8 presentando valores mínimos de 227.44 ± 4.08 mg EAC/100 g y un máximo de 13838.38 ± 87.47 mg EAC/100 g, de los cuales el polen de Tulancingo (PO TGO) fue la cifra más elevada, al contrastar su contenido con miel clara de Mérida (MC ME), miel oscura Mérida (MO ME) y jalea real de Mérida (JR ME), se encontró que éste contiene 41, 41.7 y 39.36 veces más ácido ascórbico, respectivamente.

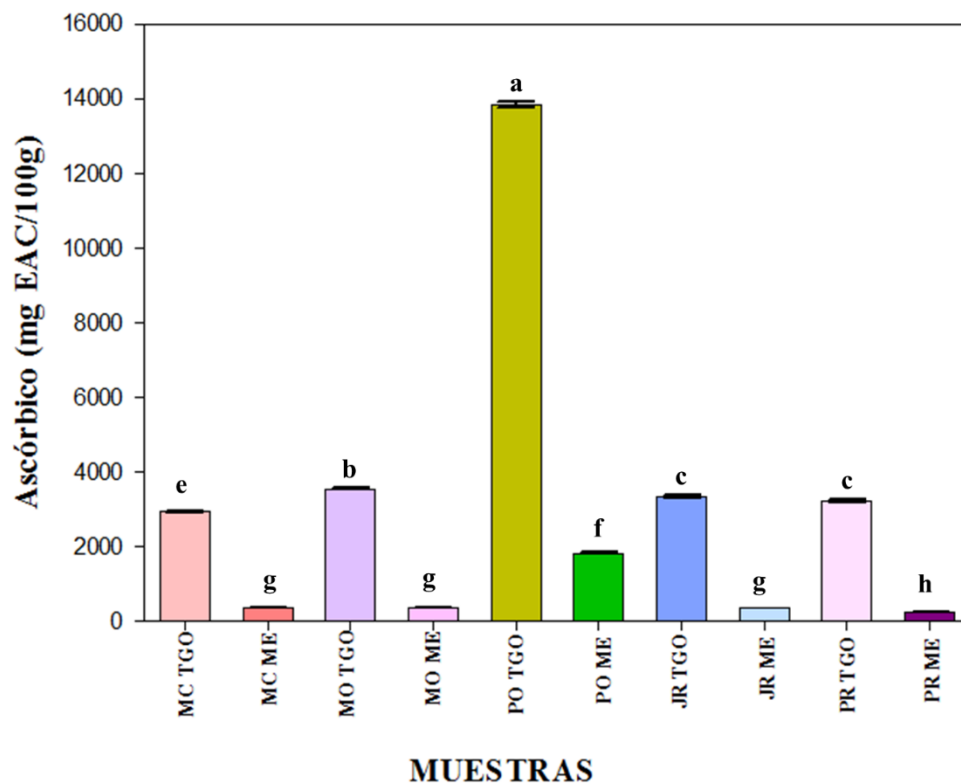


Figura 8. Contenido de ácido ascórbico (mg EAC/100g) de miel clara, oscura, jalea real, polen y propóleo Tulancingo y Mérida. ^{a-h} Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$). MC TGO=miel clara Tulancingo; MC ME=miel clara Mérida; MO TGO= miel oscura Tulancingo; MO ME= miel oscura Mérida; PO TGO=polen Tulancingo; PO ME=polen Mérida; JR TGO=jalea real Tulancingo; JR ME= jalea real Mérida; PR TGO= propóleo Tulancingo; PR ME= propóleo Mérida.

7.7 Actividad antioxidante

7.7.1 Actividad antioxidante por el método de DPPH^{•+}

Los valores obtenidos de la actividad antioxidante medida a través del radical DPPH^{•+} se muestran en la Figura 9, cabe resaltar que propóleo de Tulancingo (PR TGO) obtuvo 24250 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ siendo el valor significativamente más alto ($p < 0.05$) con respecto al resto de las muestras; al contrastarlo con la miel clara Tulancingo (MC TGO), resultó ser 295% mayor ($85 \pm 1.07\text{ }\mu\text{mol ET}/100\text{g}$), con miel clara Mérida (MC ME), 391% mayor (62.68 ± 2.24) y 404% mayor al compararlo con la jalea real de Mérida ($59.91 \pm 0.64\text{ }\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$).

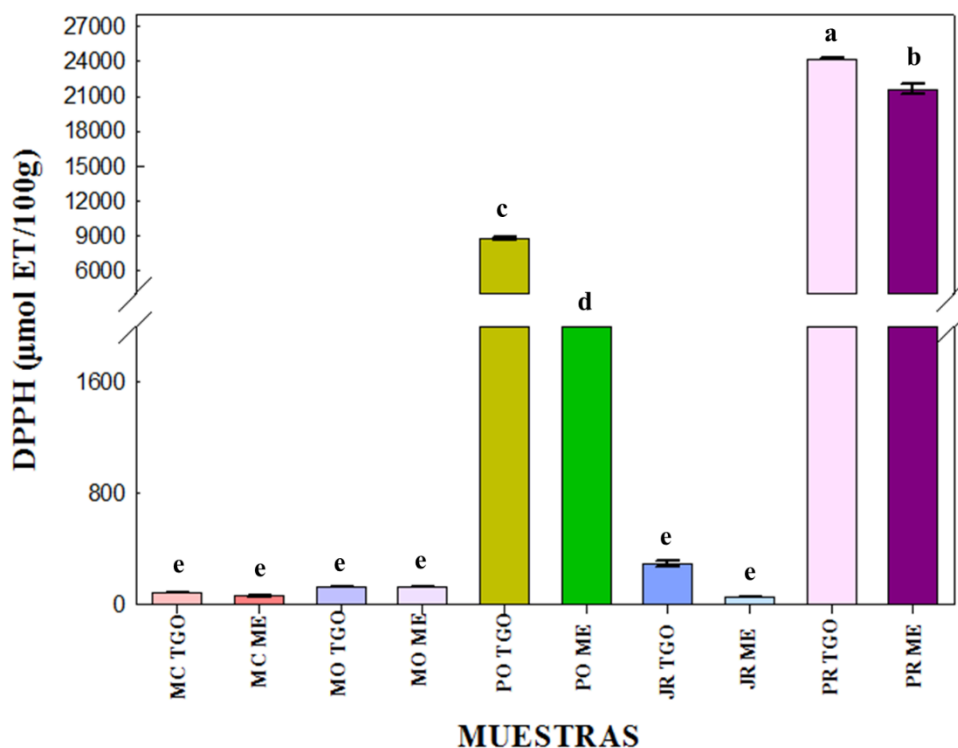


Figura 9. Actividad antioxidante por el método de DPPH^{•+} ($\mu\text{mol ET}/100\text{g}$) de miel clara, oscura, jalea real, polen y propóleo Tulancingo y Mérida. ^{a-e} Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$). MC TGO=miel clara Tulancingo; MC ME=miel clara Mérida; MO TGO= miel oscura Tulancingo; MO ME= miel oscura Mérida; PO TGO=polen Tulancingo; PO ME=polen Mérida; JR TGO=jalea real Tulancingo; JR ME= jalea real Mérida; PR TGO= propóleo Tulancingo; PR ME= propóleo Mérida.

7.7.2 Actividad antioxidante por el método de ABTS^{•+}

La actividad antioxidante a través del radical ABTS^{•+}, para las muestras oscilaron entre 3.57 ± 0.15 y 7294.48 ± 0.00 mg EAC/100 g (Figura 10), hallando en el propóleo de Mérida (PR ME) la mayor actividad antioxidante por esta metodología. Por lo contrario, el valor más bajo (3.57 ± 0.00 mg EAC/100 g) correspondió a la jalea real de Tulancingo (JR TGO).

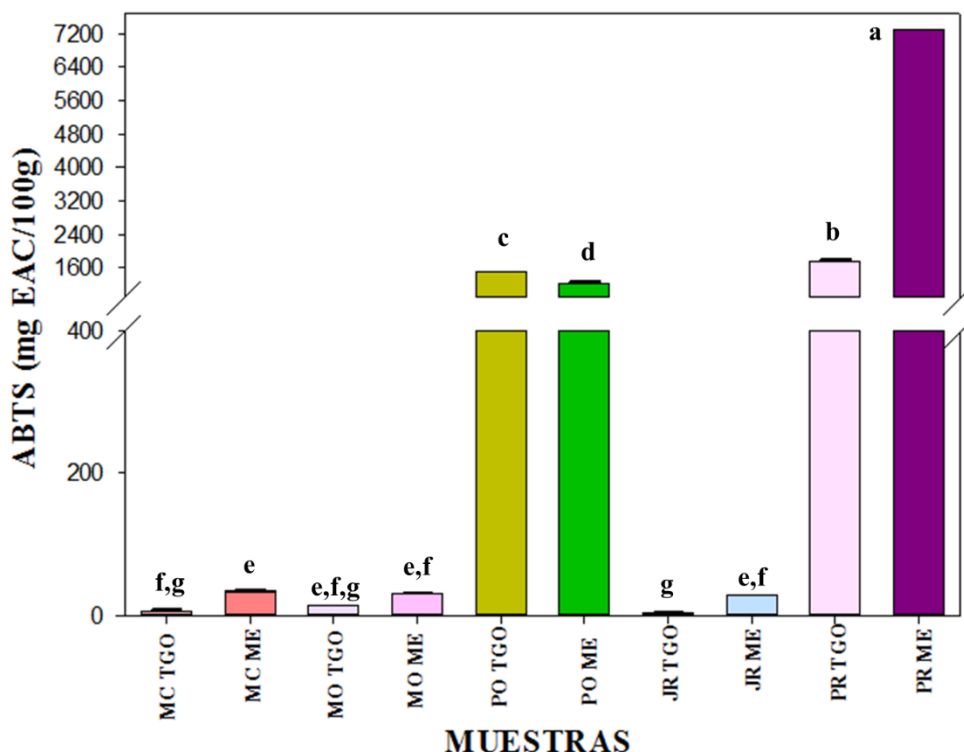


Figura 10. Actividad antioxidante por el método de ABTS^{•+} (mg EAC/100g) de miel clara, oscura, jalea real, polen y propóleo Tulancingo y Mérida. ^{a-g} Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$). MC TGO=miel clara Tulancingo; MC ME=miel clara Mérida; MO TGO= miel oscura Tulancingo; MO ME= miel oscura Mérida; PO TGO=polen Tulancingo; PO ME=polen Mérida; JR TGO=jalea real Tulancingo; JR ME= jalea real Mérida; PR TGO= propóleo Tulancingo; PR ME= propóleo Mérida.

7.7.3 Actividad antioxidante por el método de FRAP

Los resultados para la actividad antioxidante por el método de FRAP, se presentan en la Figura 11. Los valores fluctuaron entre 82.54 ± 0.72 y 5296.11 ± 60.28 mmol Fe (II)/100 g, dentro de los cuales el polen de Mérida (PO ME), mostró la actividad antioxidante más elevada, en una proporción 64.16:1 en comparación con miel clara de Tulancingo (MC TGO) y 14.27:1 con respecto al propóleo de Tulancingo (PO TGO).

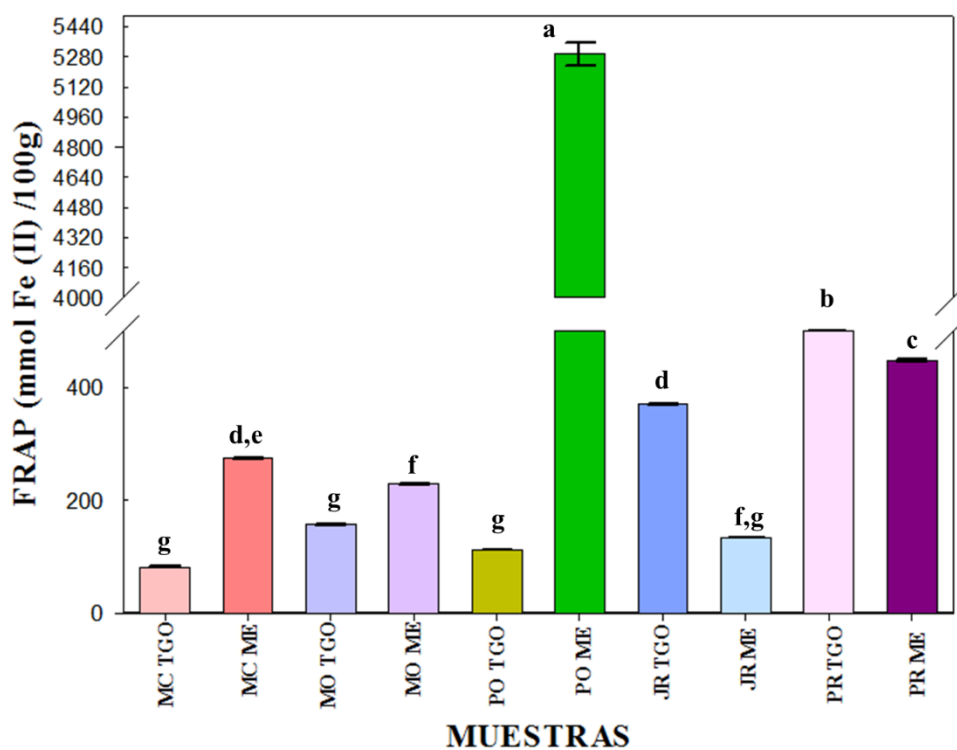


Figura 11. Actividad antioxidante por el método de FRAP (mmol Fe (II) /100g) de miel clara, oscura, jalea real, polen y propóleo Tulancingo y Mérida. ^{a-f} Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$). MC TGO=miel clara Tulancingo; MC ME=miel clara Mérida; MO TGO= miel oscura Tulancingo; MO ME= miel oscura Mérida; PO TGO=polen Tulancingo; PO ME=polen Mérida; JR TGO=jalea real Tulancingo; JR ME= jalea real Mérida; PR TGO= propóleo Tulancingo; PR ME= propóleo Mérida.

7.8 Actividad quelante

El porcentaje de actividad quelante, para cada una de las muestras provenientes de Tulancingo y Mérida se muestran en la Figura 12, se puede observar que la actividad quelante más elevada, correspondió al polen proveniente de Tulancingo (PO TGO), con $68.27 \pm 0.05\%$, exhibiendo así un 51.54% más en comparación con el propóleo Mérida (PR ME) ($16.73 \pm 0.95\%$).

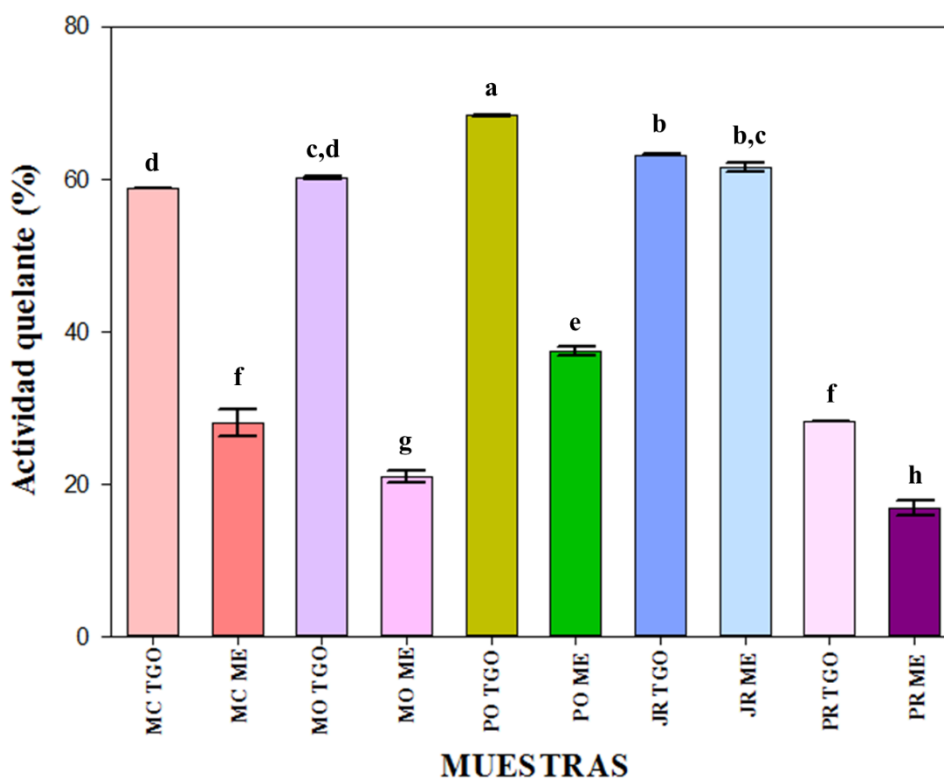


Figura 12. Actividad quelante (%) de miel clara, oscura, jalea real, polen y propóleo Tulancingo y Mérida. ^{a-h} Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$). MC TGO=miel clara Tulancingo; MC ME=miel clara Mérida; MO TGO=miel oscura Tulancingo; MO ME= miel oscura Mérida; PO TGO=polen Tulancingo; PO ME=polen Mérida; JR TGO=jalea real Tulancingo; JR ME= jalea real Mérida; PR TGO=propóleo Tulancingo; PR ME= propóleo Mérida.

7.9 Caracterización del alimento de diseño

7.9.1 Evaluación sensorial del alimento de diseño

La Figura 13, representa los resultados obtenidos de la evaluación sensorial de las diferentes formulaciones del alimento de diseño, en forma de gráfica radial, en donde cada vértice representa un atributo sensorial de importancia (color, olor, sabor, consistencia y aceptación general) y cada color de línea corresponde al código de la formulación. Se puede apreciar que la fórmula 48 tuvo mayor nivel de agrado para la mayoría de los atributos (color, olor y consistencia), con un puntaje promedio de 6.1, sabor 5.7 y aceptación general 6.0, ésta contenía 50% de miel oscura, 25% de polen, 16% de miel clara, 7% de propóleo en extracto y 2% de jalea real fresca.

Los resultados anteriores, permitieron establecer que la 48, fuera el alimento de diseño a caracterizar, a partir de la determinación de pH, sólidos solubles totales, viscosidad, análisis microbiológico, contenido de antioxidantes y capacidad antioxidante, comparándolo además con un producto similar originario de Mérida.

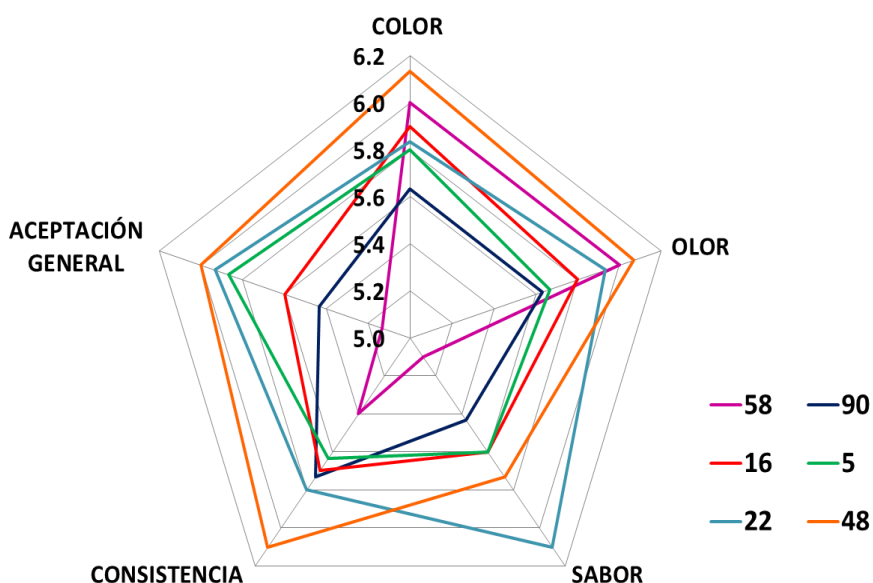


Figura 13. Resultados de la evaluación sensorial de las 6 formulaciones diseñadas, para los atributos de color, olor, sabor, consistencia y aceptación general, 30 panelistas. **Códigos de formulaciones:** 58=A1, 22=A2,05=A3, 48=A4,16=A5,90=A6.

7.9.2 pH y sólidos solubles

El comparativo del alimento de diseño y el producto Mérida con respecto a los parámetros de pH y sólidos solubles se muestran en la Tabla 7, se puede observar que el pH fue mayor significativamente ($p < 0.05$) en la muestra Mérida, en comparación al alimento de diseño.

Por otro lado, para la determinación de sólidos solubles expresados como ° Brix, el contenido más alto significativamente, se halló en la muestra de Mérida ($76 \pm 0.00^\circ \text{Brix}$), comparado con el alimento de diseño.

Tabla 8. Comparativa de pH y sólidos solubles totales del alimento de diseño y formulación Mérida

Muestra	pH	Sólidos solubles (°Brix)
Alimento de diseño	3.82 ± 0.02	71 ± 1.15
Producto comparativo de Mérida	$4.06 \pm 0.01^*$	$76 \pm 0.00^*$

*Indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras. Los resultados son promedio de triplicado $\pm$ desviación estándar.

7.9.3 Viscosidad

La cinética de la viscosidad del alimento de diseño y el producto Mérida, se muestran en la Figura 14, se puede apreciar que ambas muestras son newtonianas, pues tienen un comportamiento característico de un pseudoplástico, ya que al aumentar la velocidad de corte las muestras disminuyen su viscosidad expresada como revoluciones por minuto (rpm). La viscosidad del alimento de diseño disminuye más con respecto a la velocidad de corte en comparación a la muestra de Mérida.

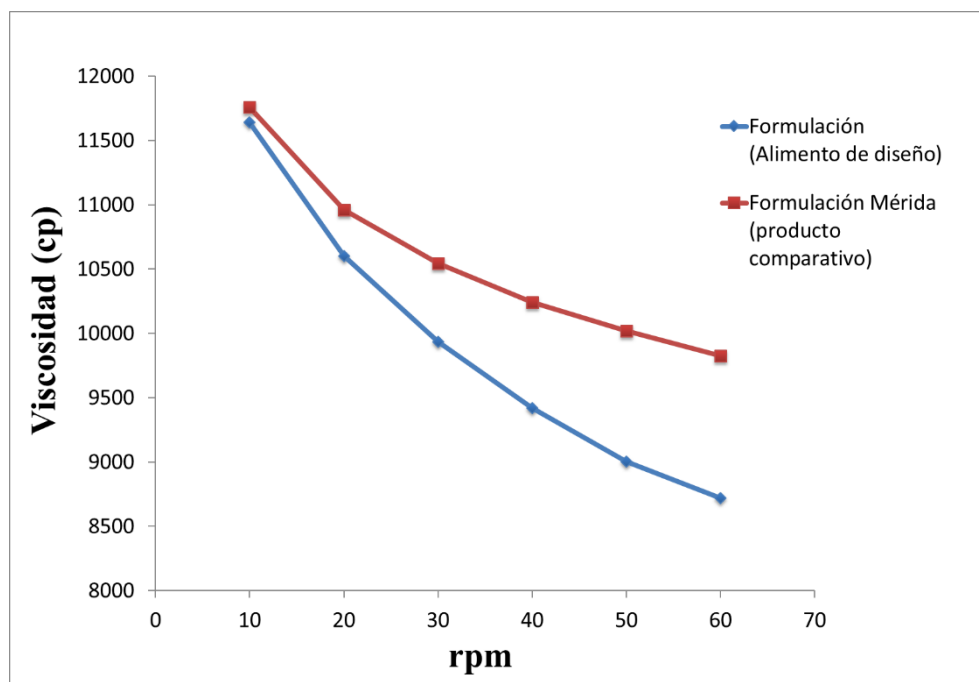


Figura 14. Cinética de la viscosidad del alimento de diseño y producto comparativo a temperatura ambiente. Resultados promedio de 3 réplicas, a 10,20,30, 40,50,60 rpm, aguja LV-4.

7.9.4 Análisis microbiológico

La inocuidad del alimento de diseño formulado se determinó llevando a cabo la determinación de microorganismos mesófilos aerobios (A), enterobacterias (B) y esporas (C). Para A se obtuvieron $1.69 \pm 0.00 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/g}$, para B, no se detectaron colonias, por último, $1.89 \pm 0.17 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/g}$ para C.

7.9.5 Contenido de antioxidantes

7.9.5.1 Betaninas y betaxantinas

Los valores correspondientes a betaninas y betaxantinas, en las muestras analizadas por tipo de extracción se muestran en la Figura 15 y 16, respectivamente. Para el contenido de betaninas los valores oscilaron entre 0.03 y 2.25 mg EB/100 g. Con respecto a la extracción acuosa orgánica el contenido mayor correspondió a FORM TGO AO, la cual fue 233% mayor en comparación a FORM ME AO. Para la extracción acuosa, en FORM TGO AC se identificó el contenido mayor, en 206% con respecto a FORM ME AC.

El valor más alto de betaninas ($p<0.05$), correspondió a la FORM TGO AC (2.25 ± 0.00 mg EB/100 g), mientras que el más bajo fue la FORM ME AO (0.03 ± 0.00 mg EB/100 g).

Con respecto al contenido de betaxantinas, en la extracción acuosa orgánica el valor más notable correspondió a la FORM TGO AO con 0.07 ± 0.001 mg EI/100g, al compararlo con FORM ME AO (0.01 ± 0.003 mg EI/100g), presentando así un contenido en una relación 7:1. Por otro lado, en la extracción acuosa, el contenido mayor de betaxantinas correspondió a la FORM TGO AC (2.63 ± 0.01 mg EI/100g), teniendo 185% más en comparación con la FORM ME AC (1.42 ± 0.006 mg EI/100g).

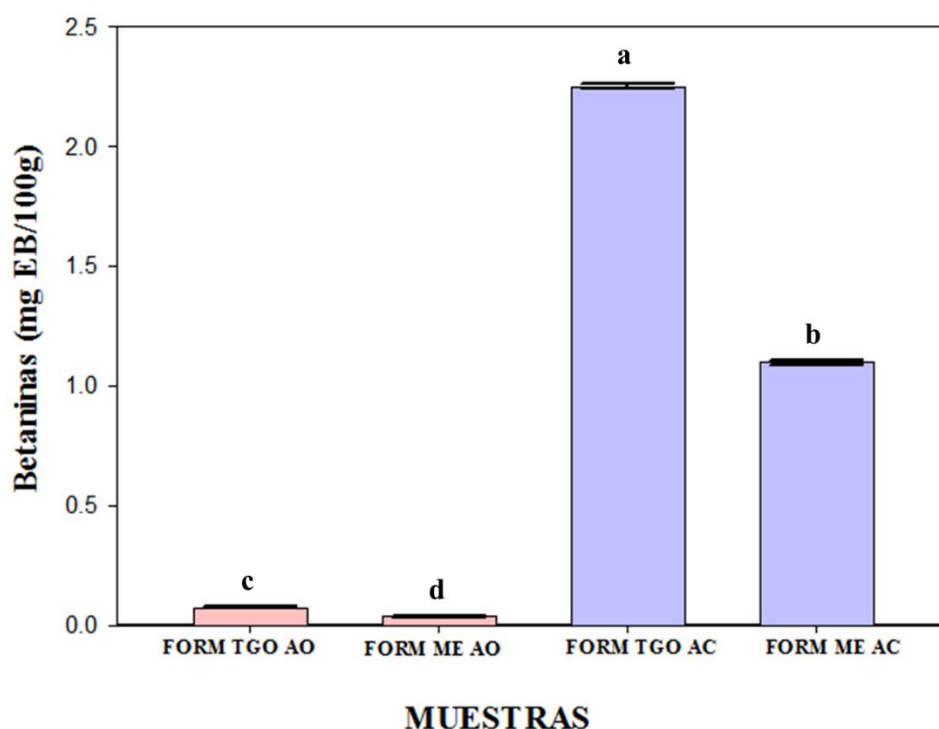


Figura 15. Contenido de betaninas (mg EB/100g) de alimento de diseño y producto Mérida.
^{a-d} Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p<0.05$). FORM TGO AO= formulación Tulancingo extracción Acuosa Orgánica; FORM ME AO= Formulación Mérida extracción Acuosa Orgánica; FORM TGO AC= Formulación Tulancingo extracción Acuosa; FORM ME AC= Formulación Mérida extracción Acuosa.

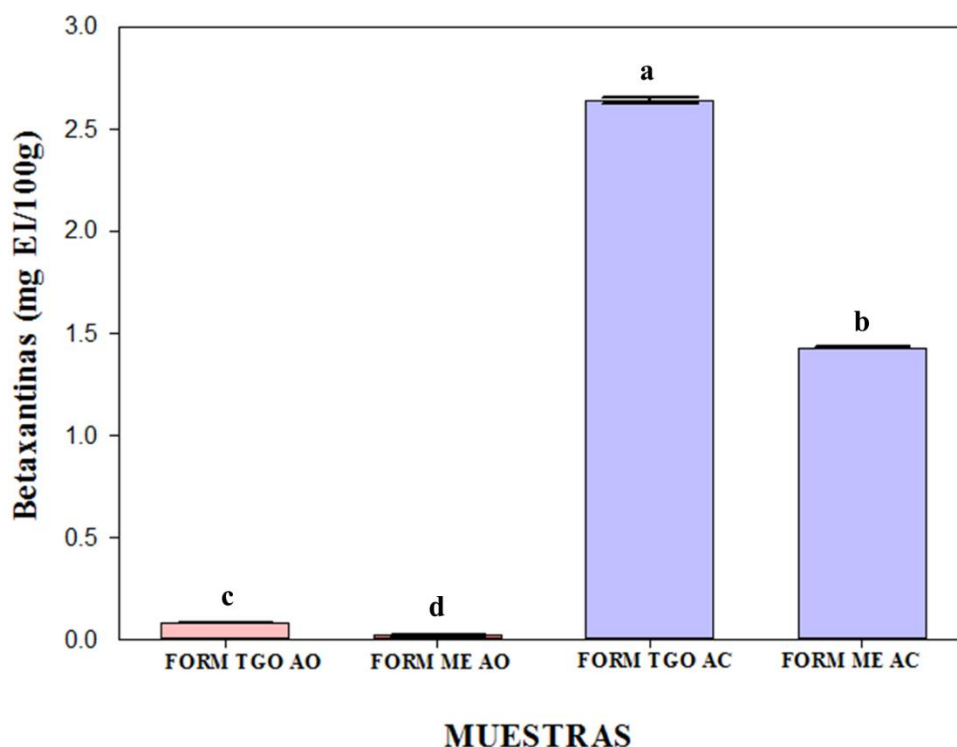


Figura 16. Contenido de betaxantinas (mg EI/100g) de alimento de diseño y producto Mérida. ^{a-d} Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$). FORM TGO AO= formulación Tulancingo extracción Acuosa Orgánica; FORM ME AO= Formulación Mérida extracción Acuosa Orgánica; FORM TGO AC= Formulación Tulancingo extracción Acuosa; FORM ME AC= Formulación Mérida extracción Acuosa.

7.9.5.2 Fenoles

El contenido de fenoles expresado como mg EAG/100 g, se muestran en la Figura 17. Se obtuvieron 2 tipos de extracción para cada muestra: extracción acuosa orgánica (metanol-acetona) y extracción acuosa (agua). Para la extracción acuosa orgánica el contenido mayor se identificó en FORM TGO AO con 550.29 mg EAG/100 g, el cual fue 1.74 veces mayor al contrastarlo con FORM ME AO. En la extracción acuosa los valores más altos se hallaron en FORM TGO AC (163.39 ± 5.52 mg EAG/100 g), sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores con FORM ME AC.

El contenido mayor significativamente ($p < 0.05$), correspondió a FORM TGO AO con 550.29 ± 15.72 mg EAG/100 g, en comparación con las demás muestras 3.36 más que la FORM TGO AC.

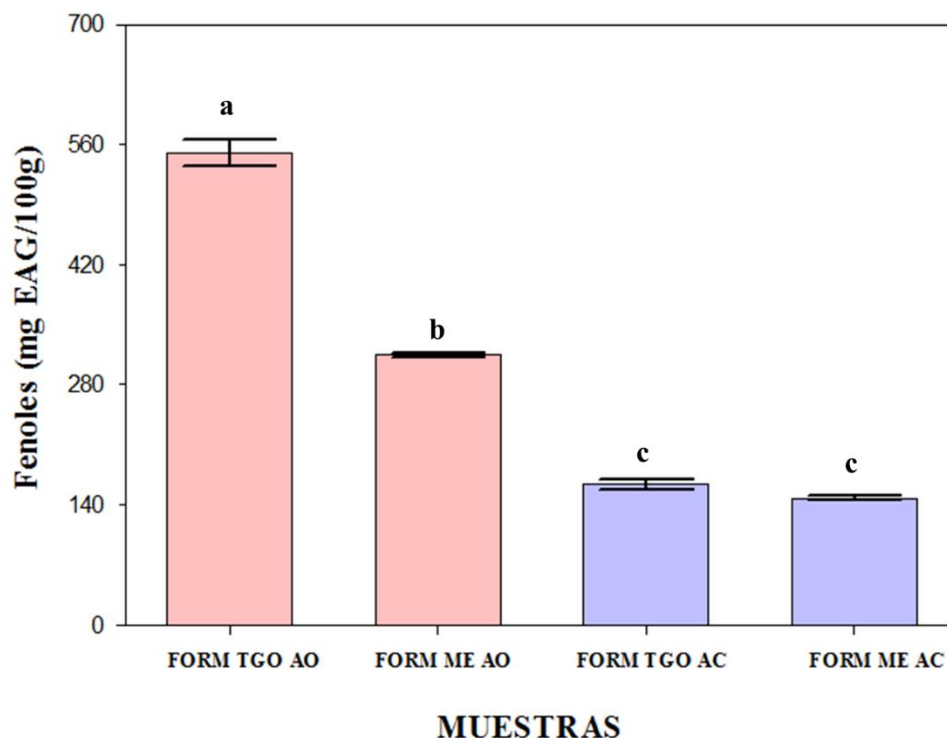


Figura 17. Contenido de fenoles (mg EAG/100g) de alimento de diseño y producto Mérida. ^{a-c} Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$). FORM TGO AO= formulación Tulancingo extracción Acuosa Orgánica; FORM ME AO= Formulación Mérida extracción Acuosa Orgánica; FORM TGO AC= Formulación Tulancingo extracción Acuosa; FORM ME AC= Formulación Mérida extracción Acuosa.

7.9.5.3 Contenido de ácido ascórbico

Se puede observar en la Figura 18, el contenido de ácido ascórbico para ambas formulaciones en los dos tipos de extracción (acuosa orgánica y acuosa). Al comparar los valores obtenidos en la extracción acuosa orgánica, el contenido mayor se obtuvo en FORM ME AO (286.86 ± 4.62 mg EAC/100g), conteniendo así 9% más ácido ascórbico con respecto a la FORM TGO AO (258.58 ± 1.74 mg EAC/100g).

Por otro lado, en la extracción acuosa, el mayor contenido se halló en FORM TGO AC, en donde al compararlo con FORM ME AC tuvo un contenido 6% mayor, sin embargo, no se mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

El valor más alto significativamente ($p < 0.05$), se identificó en FORM ME AO (Figura 18).

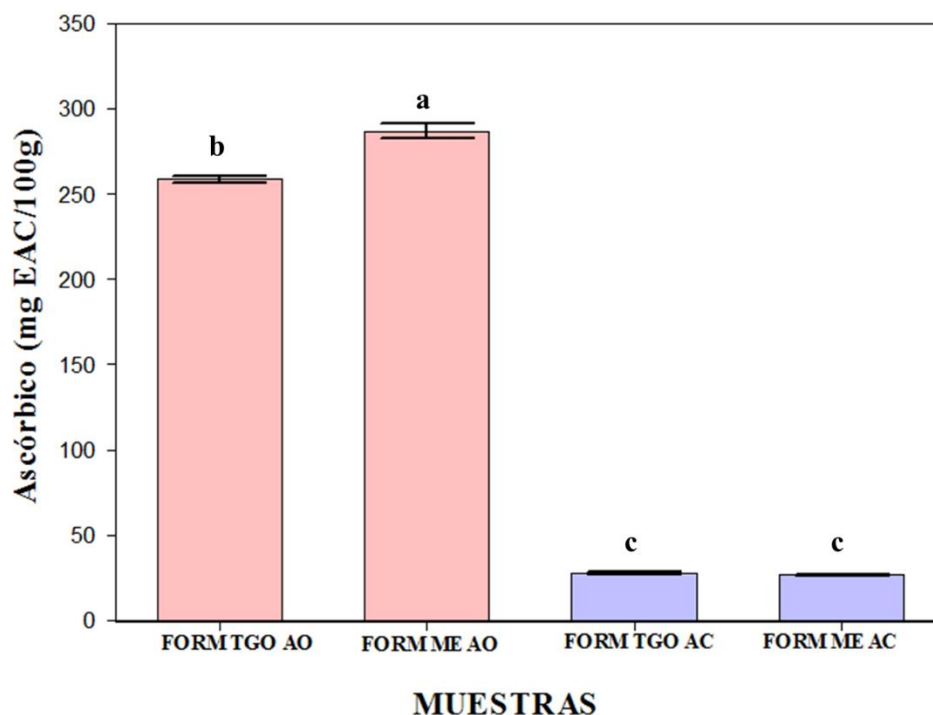


Figura 18. Contenido de ácido ascórbico (mg EAC/100g) de alimento de diseño y producto Mérida. ^{a-c} Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$). FORM TGO AO= formulación Tulancingo extracción Acuosa Orgánica; FORM ME AO= Formulación Mérida extracción Acuosa Orgánica; FORM TGO AC= Formulación Tulancingo extracción Acuosa; FORM ME AC= Formulación Mérida extracción Acuosa.

7.9.6 Actividad antioxidante

7.9.6.1 Actividad antioxidante por el método de DPPH $\bullet^+$

Los resultados obtenidos para la actividad antioxidante a través del radical DPPH $\bullet^+$, oscilaron entre 162.9 y 1385.66 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ (Figura 19).

Entre las extracciones acuosas orgánicas, el valor más alto se encontró en la FORM TGO AO ($1385.66 \pm 27.53\ \mu\text{mol ET}/100\text{ g}$), misma que mostró una actividad antioxidante en una proporción 4:1 en comparación a la FORM ME AO. En las extracciones acuosas, la FORM TGO AC ($219.90 \pm 2.50\ \mu\text{mol ET}/100\text{ g}$), arrojó la mayor actividad antioxidante, siendo 22.73% más alta al compararla con FORM ME AC ($169.90 \pm 2.50\ \mu\text{mol ET}/100\text{ g}$), no habiendo diferencias significativas ($p > 0.05$), entre ambas (Figura 19).

Finalmente, el valor mayor significativamente, correspondió a FORM TGO AO, teniendo así una proporción de 8:1 con el dato más bajo identificado en la FORM ME AC.

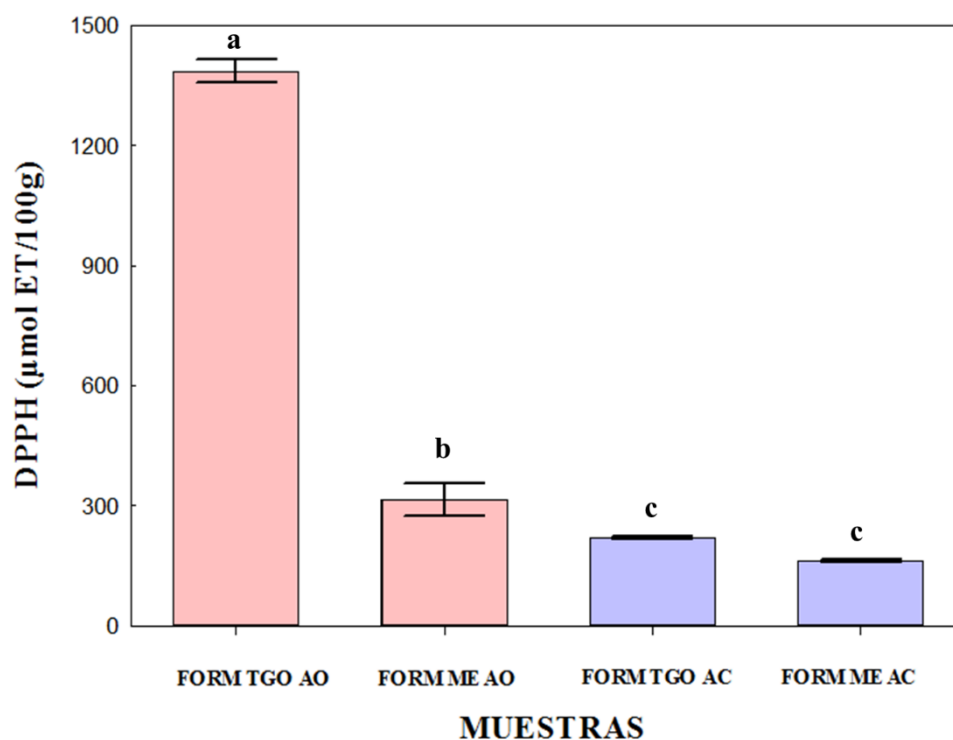


Figura 19. Actividad antioxidante por el método de DPPH^{•+} (μmol ET/100g) de alimento de diseño y producto Mérida. ^{a-c} Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras (p<0.05). FORM TGO AO= formulación Tulancingo extracción Acuosa Orgánica; FORM ME AO= Formulación Mérida extracción Acuosa Orgánica; FORM TGO AC= Formulación Tulancingo extracción Acuosa; FORM ME AC= Formulación Mérida extracción Acuosa.

7.9.6.2 Actividad antioxidante por el método de ABTS^{•+}

En cuanto a la actividad antioxidante por medio del radical ABTS^{•+}, las muestras tuvieron un comportamiento similar que en DPPH^{•+}, sin embargo, los valores oscilaron entre 5.85 y 45.81 mg EAC/100g. Los resultados obtenidos para cada muestra se pueden apreciar a detalle en la Figura 20. En la extracción acuosa orgánica los valores más altos, se identificaron en FORM TGO AO (45.81±1.90 mg EAC/100g), al compararlo con FORM ME AO (27.89±1.90 mg EAC/100g), este valor fue 0.64 veces más. Para la extracción acuosa, la FORM ME AC (8.05±0.45 mg EAC/100g), en donde en comparación con FORM TGO AC (5.85±0.42 mg EAC/100g), fue 27.32% más grande, sin encontrar diferencias significativas entre ellas.

Por último, el valor más alto significativamente ($p < 0.05$), se obtuvo en FORM TGO A, la cual al contrastarla con el dato menor correspondiente a FORM ME AO, se encontró que fue 7.83 veces mayor.

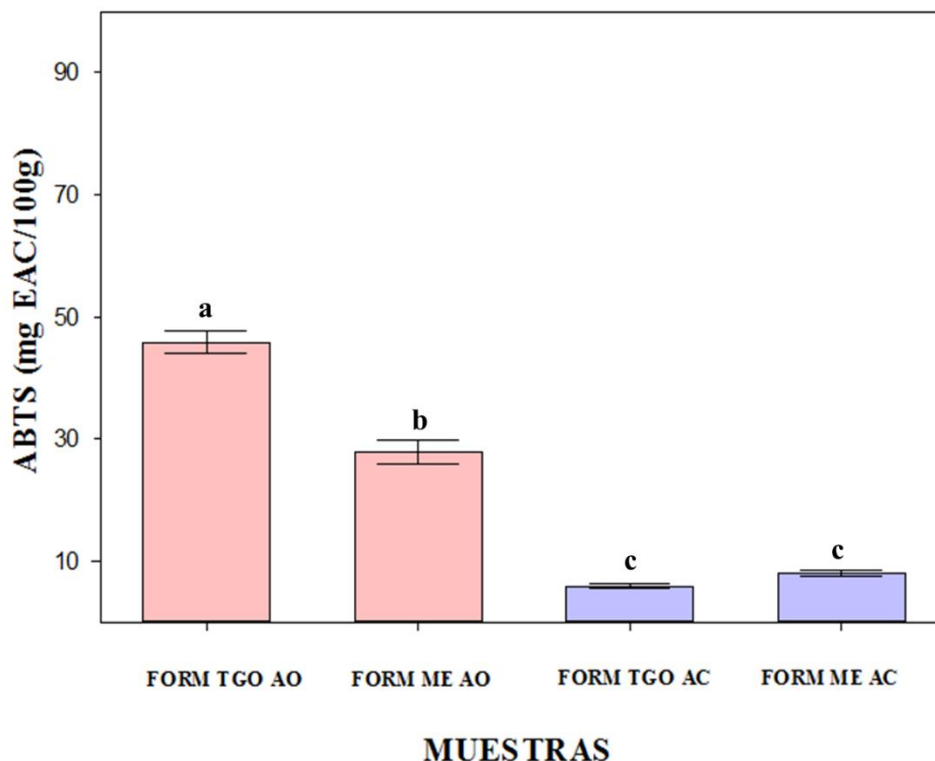


Figura 20. Actividad antioxidante por el método de ABTS⁺⁺($\mu\text{mol EAC}/100\text{g}$) de alimento de diseño y producto Mérida. ^{a-c} Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$ FORM TGO AO= formulación Tulancingo extracción Acuosa Orgánica; FORM ME AO= Formulación Mérida extracción Acuosa Orgánica; FORM TGO AC= Formulación Tulancingo extracción Acuosa; FORM ME AC= Formulación Mérida extracción Acuosa).

7.9.6.3 Actividad antioxidante por el método de FRAP

La actividad antioxidante por el método de FRAP para las formulaciones en los dos tipos de extracción se pueden apreciar en la Figura 21, para la cual los valores fluctuaron entre 151.33 y 4069.16 mmol Fe (II)/ 100g. Los resultados obtenidos para la extracción acuosa orgánica arrojaron que el valor más alto correspondió a FORM TGO AO (4069.16 ± 52.04 mmol Fe (II)/ 100g), teniendo una capacidad antioxidante en una proporción 5.74:1 en contraste con la FORM ME AO (708.00 ± 8.00 mmol Fe (II)/ 100g).

Por otro lado, para la extracción acuosa se identificó la cifra más alta en la FORM TGO AC (204.80 ± 0.40 mmol Fe (II)/ 100g), presentando así 26.10% extra en comparación (151.33 ± 0.61 mmol Fe (II)/ 100g).

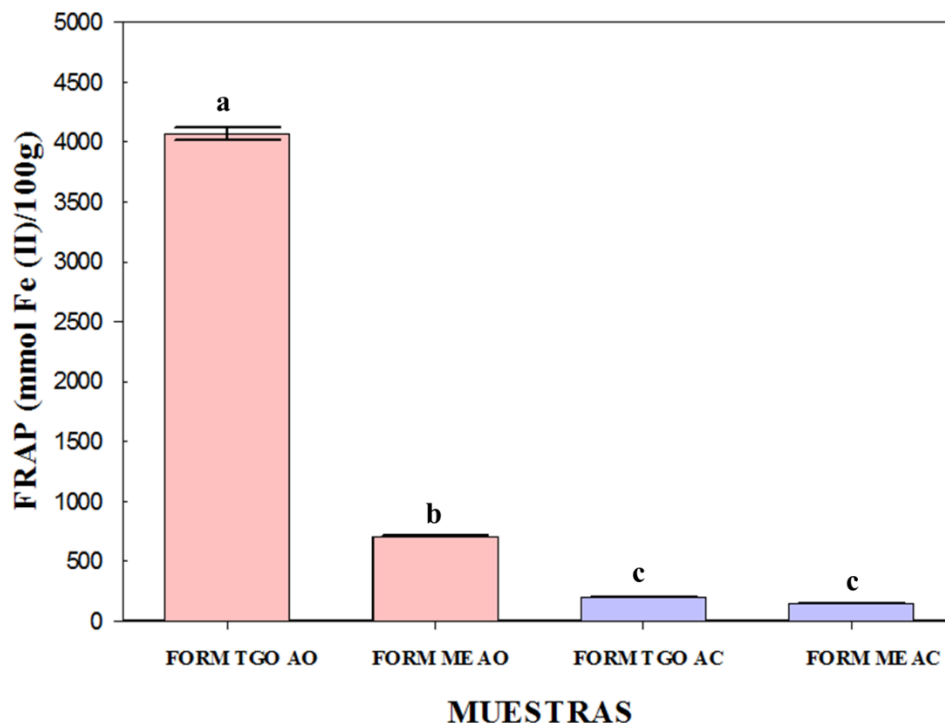


Figura 21. Actividad antioxidante por el método de FRAP (mmol Fe(II) /100g) de alimento de diseño y producto Mérida. ^{a-d} Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$). FORM TGO AO= formulación Tulancingo extracción Acuosa Orgánica; FORM ME AO= Formulación Mérida extracción Acuosa Orgánica; FORM TGO AC= Formulación Tulancingo extracción Acuosa; FORM ME AC= Formulación Mérida extracción Acuosa.

7.9.7 Actividad quelante

En la figura 22, se puede apreciar el porcentaje de actividad quelante. En la extracción acuosa orgánica, el valor más alto se encontró en FORM ME AO ($31.39 \pm 1.32\%$), obteniendo así un 11.5% extra de actividad quelante al contrastarla con la FORM TGO AO ($19.86 \pm 0.13\%$). Por otra parte, para la extracción acuosa, la actividad quelante fue mayor significativamente en FORM TGO AC ($50.51 \pm 0.30\%$), en un 3.91% en relación a la FORM ME AC ($46.60 \pm 0.55\%$).

La muestra con más actividad quelante significativamente, correspondió a la FORM TGO AO ($50.51 \pm 0.30\%$), la cual al compararla con la cifra menor hallada en la FORM TGO AO, demostró tener 30.62% más que FORM TGO AO ($19.89 \pm 0.13\%$).

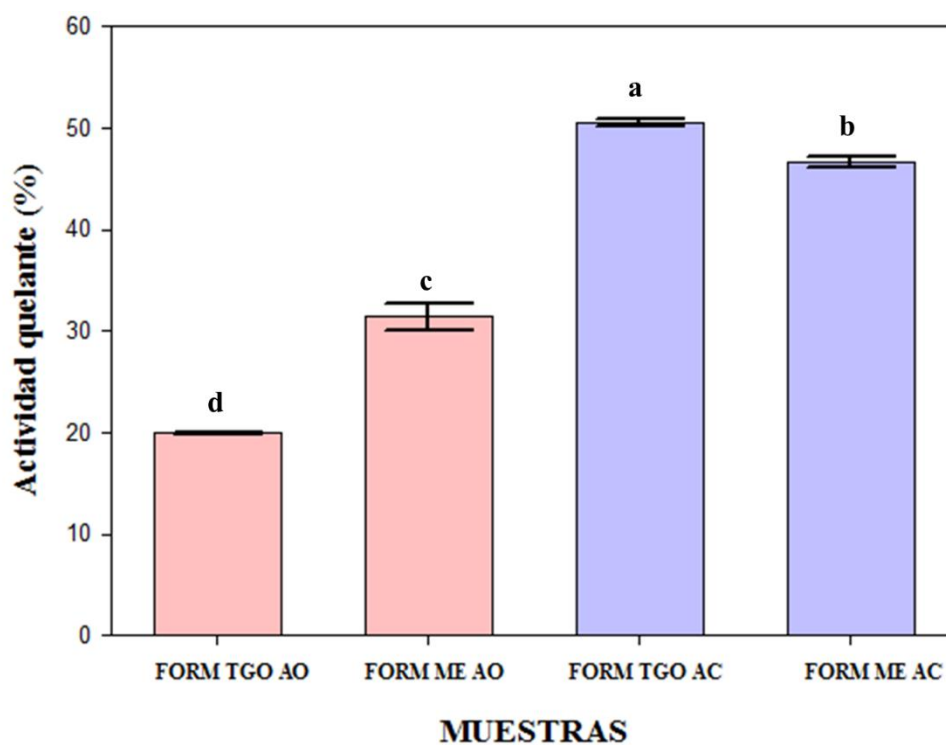


Figura 22. Actividad quelante (%) de alimento de diseño y producto Mérida. ^{a-d} Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$). FORM TGO AO= formulación Tulancingo extracción Acuosa Orgánica; FORM ME AO= Formulación Mérida extracción Acuosa Orgánica; FORM TGO AC= Formulación Tulancingo extracción Acuosa; FORM ME AC= Formulación Mérida extracción Acuosa.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.1 Propiedades nutricionales, físicoquímicas y microbiológicas de productos de la colmena de Tulancingo, Hidalgo.

8.1.1 Propiedades nutricionales

Los resultados obtenidos para la composición química proximal de los productos de la colmena analizados presentaron tendencias muy variables para cada uno de los atributos evaluados (Tabla 5).

8.1.1.1 Humedad

El contenido de agua en los alimentos, la forma molecular y su localización dentro del producto alimenticio, son factores que afectan de modo significativo las características específicas como apariencia, textura, color, etcétera (96); además se consideran como parámetros de calidad importante, sobre todo para la vida útil de los alimentos (97).

La humedad en la miel es un factor limitante en la determinación de su calidad, estabilidad y resistencia al deterioro contra la fermentación, cuanto mayor sea el contenido, mayor será la probabilidad durante el almacenamiento (98). El Codex Alimentarius (2001) y a la NMX-F-036-1997, un nivel por debajo del 20% está relacionado con una vida útil más larga (77,99), de acuerdo a los resultados descritos en la Tabla 5, las muestras de miel clara y oscura cumplieron con las especificaciones de ambas regulaciones, evidenciando que son estables frente al almacenamiento.

Por otro lado, la humedad en la jalea real es un parámetro que incide en su densidad, viscosidad, la cual está presente en una proporción alta mayor al 60% (100). Los valores presentados en la Tabla 5, demuestran que la jalea real es el producto de la colmena con el porcentaje más alto de humedad ($67.22 \pm 0.19\%$), el cual fue similar al reportado Italia en 2009 (60-70%), donde se menciona que la elevada humedad se debe al constante suministro de la misma en la colmena (panal) por las abejas nodrizas y al esfuerzo en la colonia para mantener un nivel de humedad constante (33).

Según la NORMA IRAM-2000, el porcentaje de humedad en el propóleo no debe superar el 10%, para evitar reacciones que generen productos indeseados y/o crecimiento de

levaduras (101), por lo que de acuerdo a los valores encontrados en el propóleo de Tulancingo, están dentro del valor especificado ya que presentaron 4.40% de humedad.

8.1.1.2 Cenizas

El contenido de cenizas es un atributo que representa el contenido de minerales en los alimentos. Los resultados obtenidos para las mieles se muestran en la Tabla 5, los cuales cumplen con lo establecido por la NMX-F-036-1997. Alimentos-Miel-Especificaciones y métodos de prueba (77) y por el *Codex Alimentarius* (99), indicando un valor máximo de 0.6%, estos resultados fueron similares, a investigaciones en Nigeria en el 2009 y en México en 2005 en los estados de Coahuila y Campeche (18,102), en base a lo anterior se puede deducir que aunque su proporción de cenizas es bajo, se distingue la presencia de minerales de importancia para la salud humana, en donde el potasio es el mayoritario al representar un tercio del contenido de cenizas totales en las mieles (1).

El polen fue el producto de la colmena con el aporte más alto con $1.70 \pm 0.11\%$. Fuenmayor en 2014, describe que en México debe de contener un mínimo de 1.5% y un máximo 2.2% (103), por lo que los resultados obtenidos se encuentran dentro del rango aceptable. El alto contenido de cenizas está explicado por su gran variedad de minerales entre ellos el sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, zinc; manganeso y cobre (104).

En lo que respecta al propóleo respecta, la literatura establece que la proporción de cenizas está dada por la presencia de compuestos minerales como potasio, calcio, magnesio, sodio, zinc, hierro, cloro y manganeso (22,105); pese a que no existe una norma en México que indique los rangos de calidad para este parámetro, la legislación brasileña establece un máximo de 5% (106), por lo cual de acuerdo a los valores descritos en la Tabla 5, el porcentaje de cenizas del propóleo se encuentra dentro de lo establecido al evidenciar una proporción de $0.98 \pm 0.07\%$.

Finalmente, en la jalea real las cenizas está representado por el contenido de sodio, potasio, zinc, hierro, calcio, magnesio, cobre, cromo y manganeso (33,100), su proporción en las muestras analizadas ($0.71 \pm 0.08\%$) fue similar a la reportada por García-Amoedo y colaboradores (2004) en Brasil ($0.89 \pm 0.02\%$) (107).

8.1.1.3 Extracto etéreo

Los constituyentes grasos de los alimentos consisten en diversas sustancias lipídicas, los cuales constituyen otro factor de importancia para el análisis de alimentos, pues de ello dependerá la contribución nutrimental de los mismos en términos de aporte de energía y otros nutrientes (70).

La alta proporción de grasa en el propóleo ($66.68 \pm 1.89\%$), se puede atribuir a su gran contenido de ceras, la cual contiene terpenos, triterpenos, sesquiterpenos volátiles, resinas y ácidos grasos (23).

Los resultados sobre el contenido de grasa en la jalea real (Tabla 5), coinciden con lo reportado por Bogdanov (2017), en donde muestra un aporte de 3-8% (108). Los lípidos en la jalea real representan un atributo altamente característico, dentro de los cuales está la presencia de ácidos grasos en un 90% sobre el contenido total de ellos, en donde el ácido 10-hidroxi-2-decenoico (10-HDA) representa más del 50% de estos compuestos (109). Se ha informado que los ácidos grasos en la jalea real y en particular el 10-HDA es responsable de su efecto benéfico en la salud por sus propiedades como neuroprotector (110), regulador de la respuesta inmunológica (111), antiinflamatorias (112), entre otras.

El contenido de lípidos en el polen de Tulancingo ($7.29 \pm 0.57\%$) de acuerdo a la Tabla 5, fueron similares a los descritos por Feas y colaboradores (2012), con valores de 4.0 a 6.3% (113). Entre los lípidos, de mayor importancia son los ácidos grasos esenciales, en donde se incluyen el linoleico, γ -linoleico, así como fosfolípidos los cuales ascienden al 1,5% y algunos fitoesteroles (114).

8.1.1.4 Proteínas

El polen fue la muestra que presentó el valor más alto de proteína ($17.26 \pm 0.47\%$) (Tabla 5), siendo el segundo componente más abundante. Kostić y colaboradores en el 2015, identificó la proporción de proteínas en polen de diversas zonas de Serbia, con valores similares a los de este escrito al encontrar un valor de 17.25 ± 0.06 (115). A pesar de que no hay una normativa mexicana que establezca los parámetros permitidos, los resultados expuestos, caen dentro del rango establecido en la regulación argentina que determina un valor de 15-28% del peso seco (114). Además, el polen se considera un alimento con alto

valor biológico debido a la gran variedad de aminoácidos que contiene como son metionina, lisina, treonina, histidina, leucina, isoleucina, valina, fenilalanina y triptófano (116).

Por otro lado, los valores obtenidos en la miel clara y miel oscura de Tulancingo ($0.35\pm0.15\%$ y $0.35\pm0.11\%$, respectivamente), fueron menores a lo reportado por El Sohaimy y colaboradores en el 2015 (1.69 ± 0.015 - $4.67\pm0.17\%$) (98), la variabilidad en el contenido de proteínas en las mieles depende su origen, la cantidad de polen contenido en ella y de algunas enzimas como oxidasa, invertasa y diastasa (98,117).

La fracción proteica en la jalea real de Tulancingo ($13.99\pm0.41\%$) fue similar a lo informado por Salamanca y colaboradores (2009), el cual manifestó valores de $12.7\pm0.64\%$ y $13.8\pm0.30\%$ (jalea real comercial y local, respectivamente) (100). De igual forma, las proteínas en la jalea real se consideran el segundo parámetro de importancia y de acuerdo a lo que establece la literatura este producto de la colmena es una fuente de aminoácidos como prolina; lisina; ácido glutámico, fenilalanina y serina (66).

8.1.1.5 Hidratos de carbono

Todos los productos de la colmena analizados tuvieron una alta proporción de hidratos de carbono (Tabla 5), sin embargo, las miel clara y miel oscura fueron las que presentaron el contenido más alto de carbohidratos ($75.81\pm2.81\%$ y $78.39\pm0.25\%$, respectivamente), esta alta proporción está dada por perfil de azúcares que contienen todas las mieles de abeja, especialmente el contenido de glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa, las cuales se han asociado ampliamente a características de calidad, como la viscosidad, procesos de cristalización y valor energético (118).

Seguido de la miel, se encuentra el polen, el cual mostró valores semejantes ($60.21\pm1.05\%$) a lo encontrado por Féas y colaboradores en 2012 (113) y Bertoncelj en 2018, en donde se obtuvo un valor de 59.3% (119). Su proporción de hidratos de carbono está determinada por su origen botánico y geográfico, sin embargo, se ha documentado que la fructosa, glucosa y sacarosa representan más del 90% de los mismos, el restante corresponde a fibra dietética y almidón (104,120).

En cuanto a la jalea real, los valores expuestos en la Tabla 5, fueron similares a lo que reporta la literatura que es un 16% (1), siendo la glucosa y la fructosa los azúcares que

representan más del 90% del contenido total y para el 10% se ha indicado la presencia de cantidades pequeñas de sacarosa, maltosa, trehalosa, melibiosa y ribosa (121).

8.1.2 Propiedades fisicoquímicas

8.1.2.1 pH

Los valores de pH de los cinco productos de la colmena analizados confirmaron que todas eran ácidas (3.81-4.16) (Tabla 6).

La miel es naturalmente ácida independientemente de su origen geográfico, lo que puede deberse a la presencia de ácidos orgánicos, los cuales se correlacionan con la fermentación de los azúcares contribuyendo así a su sabor, estabilidad frente al deterioro microbiano y por ende a su vida útil. También podría indicar que las muestras de miel tienen un alto contenido de minerales (122,123). Los valores obtenidos fueron cercanos a los reportados previamente en mieles de Grecia (3.49-4.9), India (3.7-4) y Egipto (4.11-4.6) (98,124,125). Así mismo los valores para ambas muestras (miel clara y oscura) estuvieron dentro del límite estándar que establece el *Codex Alimentarius* 2001 (pH 3.2-4.5), lo cual asegura la frescura de las mismas (99), además Ribeiro y colaboradores (2014) informa que un pH elevado puede ser indicador de adulteración de las mieles con jarabes (126), por lo tanto las muestras de Tulancingo son frescas y no adulteradas al cumplir con dicho rango.

Con respecto al pH de la jalea real el valor encontrado fue parecido a un trabajo realizado en Bulgaria por Balkanska y colaboradores en 2014, el cual fue de 3.95 ± 0.09 (127). Por otra parte, un bajo pH en conjunto con una baja actividad de agua en el polen (la literatura establece 0.21-0.54) está relacionada con la inhibición del crecimiento de microorganismos como mohos y levaduras, ya que influyen en su textura, estabilidad y vida útil (113). Además, el valor de pH hallado en este trabajo (3.85 ± 0.034) fue cercano al descrito por Rebelo y colaboradores (2016) en muestras de polen originario de Brasil (3.70 ± 0.01) (128). Por tanto, la muestra de polen de Tulancingo presentó poca predisposición a ser afectada por microorganismos debido a su bajo pH.

8.1.2.2 Sólidos solubles totales (° Brix)

La determinación de los grados Brix, es un parámetro que representa el porcentaje en masa de sólidos solubles totales de una solución acuosa de azúcares (129).

Como se mencionó anteriormente, la miel es una mezcla de azúcares, en donde la concentración de glucosa y fructosa, guardan una estrecha relación con la capacidad de fluir, así como de su solubilidad, de tal forma que la medición de los sólidos solubles está dada principalmente por ambos azúcares (98). Los resultados obtenidos en las muestras de miel clara y miel oscura presentados en la Tabla 6, fueron semejantes a mieles de India, con valores que oscilaron entre 78.2-80 °Brix (125), así como también con los exhibidos en Coahuila, México, en donde las mieles tuvieron 73 y 81°Brix (18).

Por otra parte, la jalea real, tuvo el menor contenido de sólidos solubles, lo cual pudiera estar relacionado con su alto porcentaje de humedad (130), así mismo los valores alcanzados en el presente escrito (36.33 ± 0.57), tuvieron similitud con un estudio llevado a cabo en Colombia en el 2009, donde compararon muestras de jalea real procedentes de Europa y África, obteniendo valores de 37.8 ± 0.67 y 35.6 ± 0.17 °Brix, respectivamente (100). Entre los azucares responsables de esta medición resalta la glucosa que alcanza hasta 2.31g/100 g, igualmente la fructosa y la sacarosa en un rango amplio que puede oscilar entre 3.10 y 8.20 g/100 g y en menor proporción maltosa, gentiobiosa, isomaltosa, trehalosa (100,121).

8.1.2.3 Acidez titulable

La acidez titulable es una medición que corresponde a la cantidad de hidróxido de sodio utilizado para neutralizar los grupos ácidos orgánicos en un alimento (131), estos se han utilizado en la conservación de alimentos y como una nueva generación de promotores de crecimiento en lugar de antibióticos (104).

Como se puede observar en la Tabla 6, el polen fue el producto de la colmena con la mayor acidez. El compuesto responsable de la acidez en el polen es el ácido glucónico, el cual puede alcanzar una concentración de hasta 3.2g/100g (104). Fuenmayor (2014), encontró un mínimo de 155 mEq/kg y un máximo de 402 mEq/kg (103), la variabilidad de los resultados pudiera al método empleado el cual tuvo algunas diferencias con respecto Fuenmayor, ya que en el realizaron un monitoreo del pH durante la titulación.

Con respecto a la miel, el ácido predominante de igual forma es el glucónico, su presencia, se origina a partir de la actividad de la glucosa oxidasa, la cual es de gran interés

ya que causa la producción de peróxido de hidrógeno que no solo estabiliza la maduración del néctar contra el deterioro, sino que también tiene una acción microbiciada (132). La NMX-F-036-1997 establece un máximo de 40 mEq/kg de ácido (77), por lo que a partir de los datos expuestos en la Tabla 6, las mieles estudiadas (miel clara y oscura) cumplieron con este parámetro al contener 21.00 ± 1.73 mEq y 28.33 ± 2.88 mEq/kg. Aazza y colaboradores (2014) en Marruecos, reportó valores para una miel de lavanda de 21.10 ± 0.70 mEq/kg y 27.00 ± 0.7 mEq/kg para una multifloral (133), los cuales fueron similares a la miel clara y miel oscura respectivamente. Por tanto, se puede deducir que las muestras de miel de Tulancingo, tienen estabilidad contra el deterioro causado por los microorganismos, al cumplir con lo establecido por la norma anteriormente mencionada.

En cuanto al propóleo, su acidez está dada por el ácido benzoico y sus derivados, el cual además de conferirle esta propiedad (acidez), permite al propóleo una actividad antimicrobiana (134), inclusive, ha sido utilizado en extracto como conservador de salchichas, como lo describe Viera y colaboradores (2016) (135), por tanto el propóleo al formar parte del alimento de diseño le conferiría una estabilidad frente al almacenamiento y desarrollo microbiano.

Por último, el ácido 10-hidroxi-2 decenoico, mejor conocido como 10-HDA es el más abundante en la jalea real, al cual se le atribuye gran parte de su acidez y olor característico, el cual ha demostrado actividades biológicas y farmacológicas (136,137), actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y negativas (138) y se utiliza como marcador de la calidad y autenticidad (33). La acidez en la jalea real de Tulancingo, fue menor a lo referido por Salamanca-Grosso y colaboradores (2009) en Colombia, en el cual se compararon muestras de abejas africanas y europeas, hallando valores de 346.30 ± 13.2 mEq/kg y 268.00 ± 0.25 mEq/kg (100).

8.1.2.4 Hidroximetilfurfural (HMF)

El HMF es un aldehído producido por la degradación del azúcar a través de la reacción de Maillard (reacción de pardeamiento no enzimático) durante el procesamiento de alimentos, como la aplicación de calor o el almacenamiento prolongado (139).

La determinación de la concentración de HMF es ampliamente reconocida como un parámetro que afecta la frescura y calidad de la miel (140,141), ya que cuando ésta es sometida a altas temperaturas, almacenada durante mucho tiempo y/o en presencia de luz, genera como resultado una mayor descomposición del peróxido de hidrógeno, mayores cantidades de reacciones redo las cuales pueden influir sobre la estabilidad de los antioxidantes y así como una disminución en el contenido de aminoácidos, lo cual se debe a su vez a transformaciones químicas que ocurren por las reacciones de Maillard (142–144). Existen normativas internacionales y nacionales, como el Codex Stan 12-1981 y la Unión Europea (Directiva 110/2001), quienes establecen que el contenido de HMF en la miel después de su elaboración y/o mezcla no debe ser superior a 40 mg/kg y para mieles de ambientes tropicales, debe contener un máximo de 80 mg/kg (145,146), mientras que la NMX-F-036-1997, determina un valor máximo de 150 mg/kg (77). Tomando en cuenta los valores obtenidos de las muestras de miel clara y oscura (Tabla 7), las mieles evaluadas cumplen con los parámetros establecidos en las tres reglamentaciones, con 20.4 mg/kg en miel clara y 21.9 mg/kg en miel oscura, concluyendo así que las mieles analizadas no tenían mucho tiempo de almacenamiento y fueron tratadas en condiciones térmicas adecuadas durante su proceso de obtención. Estos resultados difieren de los obtenidos por Pasias (2017), en dónde se estudiaron mieles multiflorales de Grecia, quien menciona que la variación de este parámetro depende drásticamente si la miel es fresca, pues el HMF aumenta conforme la miel envejece (147).

8.1.2.5 Viscosidad

La evaluación de la viscosidad en las mieles representa una propiedad importante en los aspectos tecnológicos de su producción ya que proporciona información sobre la variación estructural de los azúcares, los cuales pueden verse afectados por diversos parámetros como la temperatura, contenido de humedad y la presencia de cristales o coloides en el producto (148). Draiaia (2015), menciona que la proporción de fructosa/glucosa es un indicador que afecta la viscosidad en mieles, así entonces una relación por debajo de 1.0 provoca una cristalización más rápida teniendo una viscosidad mayor y se convierte más lenta cuando dicha relación es mayor de 1.0, confiriéndole una menor viscosidad, ello pudiera explicar por qué la miel clara de Tulancingo tiene una mayor viscosidad en comparación a la miel oscura de Tulancingo (149).

Por otro lado, la aparición de las curvas del comportamiento reológico de las mieles en la Figura 4, confirma que la naturaleza de las muestras bajo análisis es no newtoniana, pues la viscosidad fue disminuyendo al tiempo que aumentaba la velocidad de corte, generando un cambio en su consistencia al adelgazarse (150). Pocos autores han informado sobre este comportamiento en miel, sin embargo se sugiere que puede ser debido a la presencia de compuestos de alto peso molecular como proteínas o polisacáricos (dextrano) (151). Comportamiento similar para ambos tipos de mieles, fue el observado por Witczak y colaboradores (2011) en muestras de miel originarias de Polonia (150) y resultados similares a los de miel oscura en mieles de India (1140-5018) (125).

La utilidad de las propiedades reológicas en este escrito se sugiere que radica en su contenido de polisacáridos como los dextranos, los cuales estarían siendo aportados en el alimento de diseño a través de la mezcla de ambos tipos de mieles con otros productos de la colmena. Dentro de la industria alimentaria los dextranos se utilizan como agentes para la inhibición de la cristalización del azúcar, como gelificantes en caramelos y jaleas, espesantes, así como emulsionantes (para la estabilización de las partículas de una emulsión) (152,153).

8.1.3 Análisis microbiológico

El diagnóstico de la calidad microbiológica de un alimento permite la evaluación de las condiciones de procesamiento, almacenamiento y distribución, así como la presencia de microorganismos, en el polen de abeja, se relaciona con prácticas inadecuadas durante su manipulación (154). Los resultados obtenidos con respecto a mesófilos aerobios demuestran su presencia en el polen ($1.95 \pm 0.24 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/g}$); resultado de la exposición continua del polen al medio ambiente, así como por la interacción de las abejas con el mismo (155). No se cuenta con alguna regulación de los parámetros microbiológicos, sin embargo, los resultados obtenidos fueron menores a los reportados por De-Melo (2015) en polen brasileño con $2.04\text{-}2.88 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/g}$ (156).

La miel por su lado, es un alimento de humedad intermedia, con un pH ácido, humedad y actividad de agua bajas, elevada viscosidad, alta concentración de azúcares y presión osmótica alta, por lo que la hacen un sustrato poco apto para el desarrollo microbiano (157). Algunos autores también puntualizan que la actividad antimicrobiana de la miel se debe a la presencia de peróxido de hidrógeno producido por la enzima glucosa-oxidasa, los

flavonoides, ácidos aromáticos y los antioxidantes fenólicos (158), otros sugieren que debido a su alta osmolaridad generada por el gran contenido de carbohidratos en forma de azúcares, las bacterias no tienen suficiente acceso al agua para crecer y en consecuencia, los microorganismos se deshidratan y finalmente mueren (159,160). Todo lo anterior explica la ausencia de UFC en las muestras de miel, además, los resultados coinciden con las encontradas por Malika y colaboradores y por Iurlina en 2005 (132,161).

Para el recuento de enterobacterias, no se detectaron microorganismos, por lo que las muestras no presentan riesgo sanitario. Los resultados concuerdan con Iurlina (2005), en muestras de miel y con los parámetros establecidos por la NMX-F-036-1997, la cual establece que la miel no debe contener enterobacterias (77,161). Tampoco se detectaron esporas en mieles, propóleo y jalea real. En Colombia en el 2010, así mismo se demostró también ausencia de esporas en miel (162).

Por lo anterior, las muestras analizadas tuvieron un correcto buenas prácticas de higiene durante su obtención, procesamiento y almacenamiento.

8.2 *Propiedades funcionales de productos de la colmena de Tulancingo y Mérida*

8.2.1 Contenido de antioxidantes

Actualmente, la cuantificación de compuestos antioxidantes es de gran interés, debido a su capacidad donante de átomos de hidrógeno, que los convierte en una alternativa para prevenir y |contrarrestar enfermedades asociadas al estrés oxidativo, como el cáncer, diabetes y las enfermedades cardiovasculares (163). La cuantificación de betaninas y betaxantina se presenta en la Figura 5 y 6, expresadas como betaninas y equivalentes de indicaxantinas, respectivamente.

8.2.1.1 Betalaínas (betaninas y betaxantinas)

Las betalaínas son un grupo de pigmentos que se dividen en betaninas (más abundantes en frutos y dan coloración rojo-púrpura) y betaxantinas (proveen coloración amarillo-naranja) (82). Diversas publicaciones señalan las propiedades antioxidantes de estos compuestos y su importancia al ser apreciados como ingredientes nutraceuticos promotores de la salud (164–166).

Los resultados mostrados en la Figura 5 reflejaron que el valor más alto de betaninas correspondió al propóleo de Mérida (19.46 ± 1.09 mg EB/100g). No existen evidencias científicas sobre la determinación de este compuesto en muestras de propóleo, no obstante, García-Cruz y colaboradores en 2016, identificaron un contenido de 42.4-57.1 mg EB/100g en muestras de xoconostle y pitaya de Puebla (167), mayor a lo observado en este documento.

En relación al contenido de betaxantinas, la muestras de propóleo (PR TGO con 51.59 mg EI/100g y PR ME con 1.14 mg EI/100g) mostraron el contenido más alto; sin embargo, el propóleo de Tulancingo resultó ser el producto de la colmena con el mayor aporte. No existe evidencia que describa la proporción de este pigmento en productos apiarios, por lo que, comparando los valores hallados en este trabajo, con lo exhibido por Ramírez-Ramos (2015) en México de diferentes variedades de tuna, los resultados en la tuna púrpura (10-59.18 mg EI/100), fueron semejantes al propóleo de Tulancingo (PR TGO) y los valores para las variedades Alteña Blanca, Plátano, Huatusco, se consideran similares al resto de las muestras (0.21-2.76mg EI/100g) (168).

8.2.1.2 Fenoles

Dentro del amplio grupo de compuestos funcionales de los alimentos, están los polifenoles, ellos son importantes para el desarrollo y el buen funcionamiento de las plantas, ya que actúan como atrayentes de animales para la polinización, agentes protectores contra la luz UV o contra la infección por organismos fitopatógenos. Su contenido es muy variable, ya que depende de muchos factores como la variedad o el grado de maduración del mismo (169,170).

De acuerdo con Cartaya, (2001), los compuestos fenólicos que poseen un gran número de grupos hidroxilos insustituídos, se encuentran combinados con glucosa, galactosa, arabinosa etc., los cuales son compuestos considerados no polares, por lo que son moderadamente solubles en solventes como etanol, metanol, butanol, acetona, DMSO (dimetilsulfóxido) (170); ello puede explicar parte del porque el propóleo de Tulancingo fue la muestra con mayor contenido de fenoles, ya que en su procedimiento de extracción se utilizó una solución etanólica además el propóleo se caracteriza por una composición química compleja y diversificada, dependiendo de la planta de la que se recolecta y de muchos factores como es el clima o la humedad del ambiente, es así como entre sus tantos

componentes, el papel más importante hacia la salud se le atribuye a sus compuestos fenólicos, en los cuales se han identificado ácidos fenólicos como el protocatéquico, *p*-cumárico, ferúlico y cafeico (171,172). Lamentablemente, pocas evidencias han sido desarrolladas con propóleos mexicanos, pero es evidente que aporta una actividad biológica relevante, derivado de sus compuestos antioxidantes que contiene. Los valores obtenidos en este escrito (Figura 7) difieren de los presentados en una investigación realizada en propóleo de Jalisco, México en el cual se exhibieron valores de 26,000 mg EAG/100g (173).

Por otro lado, el contenido de fenoles en las mieles analizadas en comparación con las de otros países, la miel clara de Tulancingo (37.98 mg EAG/100g), presentó similitud a lo reportado por Moniruzzaman y colaboradores en el 2013 (Malasia), con valores de 35.27 mg EAG/100g) (174). Los valores arrojados en la miel oscura de Tulancingo (52.38 mg EAG/100g) evidencian, un contenido semejante a lo encontrado en miel proveniente de Malasia (58.92 mg EAG/100g) (175). Con respecto a las muestras de miel de Mérida, ambas (miel clara y oscura) fueron menores a lo reportado por Álvarez-Suárez (2010) (65), la variabilidad en su contenido se esperaba ya que las propiedades y composición de la miel se ven muy afectadas por diversos factores como puede ser la fuente del néctar, temporada de recolección y condiciones de almacenamiento (176). Algunos de los compuestos bioactivos existentes en la miel que se han reportado son galangina, apigenina, quercetina, kaempferol, luteolina e isorhamnetina y naringenina (177).

Los resultados obtenidos en la jalea real de Tulancingo y Mérida (389.44 ± 0.40 y 6.92 ± 0.09 mg EAG/100 g; respectivamente), arrojaron una presencia menor a lo reportado por Čeksteryte y colaboradores (2016) en muestras de Lituania ($1,070 \pm 3.00$ mg EAG/100g) (178) (Figura 7). Se han documentado numerosos compuestos fenólicos en la jalea real, entre ellos la herperetina, naringenina, acacetina, apigenina, crisina, luteolina y kaempferol (179).

Finalmente, en base a los datos expuestos en la figura 7, se observó en polen un total de 1583.86 ± 1.15 EAG/100 g, los cuales fueron similares con respecto a los reportados por Morais y colaboradores (2011) en polen portugués (mínimo de 1050 y máximo de 1680 EAG/100g (180). Algunos de los compuestos que se han identificado en el polen son el ácido clorogénico, ácido gálico, ácido ferúlico, cinámico, cafeico, quercetina, kaempferol y miricetina (181).

8.2.1.3 Ácido ascórbico

Es un representante del grupo de las vitaminas hidrosolubles, que se puede sintetizar por las plantas y por muchos mamíferos, pero no por el humano, está presente en pequeñas cantidades en los alimentos, siendo indispensable para la vida y la salud, por lo que el desarrollo de los métodos para la determinación de este compuesto han recibido una atención creciente, ya que actúa como antioxidante contra una variedad de enfermedades y desempeña muchas funciones fisiológicas (182,183).

El ácido ascórbico estuvo presente en mayor concentración en el polen de Tulancingo (Figura 8), los resultados obtenidos en la presente investigación difieren a lo informado por Bonta en el 2013, en Rumania (184), la diferencia se puede explicar por la variabilidad climática, región y al período del año en que se recolectaron las muestras (185). Por otro lado, se ha establecido que el proceso de deshidratación que se lleva a cabo en el polen, pudiera dar lugar a procesos de fermentación y deterioro, mismo que puede provocar una pérdida en el aporte del ácido ascórbico durante su procesamiento y almacenamiento (186). Por tanto, se pudiera inferir que las combinaciones de estos factores anteriormente mencionados juegan un papel determinante en la modificación del contenido de ácido ascórbico aun siendo originarios del mismo país tal como sucedió en el polen de Mérida.

8.2.2 Actividad antioxidante y actividad quelante

Existen sistemas de defensa antioxidante en los seres que tienen la propiedad de impedir la acción nociva de los radicales libres, sin embargo cuando los sistemas son insuficientes, resulta necesario el proveerle al organismo sustancias antioxidantes exógenas a partir de los alimentos (187). La actividad antioxidante de ciertos alimentos depende del contenido de una mezcla de antioxidantes con diferentes mecanismos de acción e interacciones sinérgicas. Por este motivo, es necesario aplicar varios métodos para determinar la capacidad antioxidante *in vitro* de los alimentos (90).

Numerosas investigaciones *in vitro* con métodos utilizando por DPPH^{•+}, ABTS^{•+} y FRAP han confirmado su potencial antioxidante de los productos de la colmena, la cual puede estar determinada por diversos factores, en el caso del polen está determinada por el contenido de polifenoles y flavonoides anteriormente mencionados (181). En cuanto a la jalea real, sus propiedades antioxidantes se atribuyen principalmente a la presencia de ácido 10-

hidroxi-2-decenoico y aminoácidos libres que incluyen prolina, cistina y cisteína (188). Por otra parte, los compuestos fenólicos diferentes a los flavonoides (como el ácido cafeicoquinico y artepilina C) y los flavonoides existentes en el propóleo, son responsables de su actividad antioxidante (189,190).

En relación a la actividad antioxidante de la miel, se debe a la presencia de una variedad de compuestos como los flavonoides (apigenina,, kaempferol, quercetina, y crisina), ácidos fenólicos (ácido gálico, cafeico, *p*-cumárico y ferúlico), ácido ascórbico, tocoferoles, superóxido dismutasa, productos de reacción de Maillard, péptidos, aminoácidos y selenio, dentro de los cuales el que aporta gran parte de la actividad y el más potente es el ácido gálico (191,192).

Así entonces, en base a los compuestos con actividad biológica en los productos de la colmena que le confieren su actividad antioxidante, se han llevado a cabo investigaciones en modelos humanos, animales y en tejidos con la finalidad de evaluar el efecto benéfico en la salud humana, en diversas afecciones como las enfermedades crónicas no transmitibles, cáncer, inflamatorias, las cuales se mencionaron con anterioridad en el apartado de antecedentes.

8.2.2.1 Actividad antioxidante por DPPH^{•+}

La molécula de DPPH^{•+}, se caracteriza por ser un radical libre que tiene mayor afinidad para interpretar la actividad antirradical de compuestos liposolubles, ya que no puede disolverse en medios acuosos (193). Los resultados para cada una de las muestras analizadas se presentan en la Figura 9.

La mayor actividad antirradical por este método se observó en el propóleo de Tulancingo (PO TGO), con un porcentaje de captación de radicales mayor a lo reportado por Marghitas y colaboradores (2009), (60.34% y 50%; respectivamente), en donde además se encontró una correlación positiva entre la concentración de flavonoides totales y la actividad antioxidante por este método, mismo que puede explicar la razón del porque el PO TGO presento la más contenido de fenoles y por consiguiente mayor actividad antioxidante por DPPH^{•+} (194). Así mismo, la elevada actividad antirradical del propóleo pudiera estar relacionada con la alta proporción de lípidos (extracto etéreo), del propóleo, pues el ensayo

DPPH^{•+} es a fin a compuestos liposolubles. En adición, el propóleo de Tulancingo (PR TGO) y Mérida (PR ME), presentaron una actividad alta ($24,250 \pm 54.12 \mu\text{mol ET}/100\text{g}$ y $21615 \pm 404.76 \mu\text{mol ET}/100\text{g}$; respectivamente), de igual forma observada por Palomino en 2009 (3390 y $32460 \mu\text{mol ET}/100\text{g}$) (195).

Los valores obtenidos para las muestras de miel evaluadas (MC TGO, MO TGO, MC ME y MO ME) presentaron una actividad menor a lo reportado por Anand y colaboradores (2018), en mieles australianas, mismos que manifestaron un intervalo de 687 - $1869 \mu\text{mol ET}/100\text{g}$. Por otro lado, las mieles oscuras (MO TGO y MO ME), tuvieron valores mayores comparado con las mieles claras (MC TGO y MC ME), hecho que puede ser explicado por una correlación entre el color y la actividad antioxidante, de modo que a mayor color mayor actividad antioxidante (196). Con respecto al porcentaje de captación de radicales, las mieles analizadas presentaron un intervalo de 30.75 a 53.87% , siendo similar a lo reportado por Moniruzzaman (2013) en miel de Malasia al observar un rango de 41.30 - 59.89% (174).

Finalmente, las muestras de polen exhibieron una captación de radicales libres de 45.14% y 78.96% (PO TGO y PO ME respectivamente), siendo similar al rango reportado por Dos Santos-Vasconcelos (2017) (42.35 - 78.58%) (197).

8.2.2.2 Actividad antioxidante por ABTS^{•+}

La utilización del sustrato ácido 2,2 azinobis (3-etilbenzotiazilina-6-sulfonato), es un método eficaz para evaluar la actividad antioxidante al actuar con compuestos de naturaleza lipofílica e hidrofílica (193).

Palomino en 2009, identificó en propóleo colombiano una actividad antioxidante, de 45550 - $109100 \text{ mg EAC}/100\text{g}$ (195), el cual fue mayor a lo obtenido en el PR TGO y PR ME (1766.88 ± 26.07 y $72994.48 \pm 0.00 \text{ mg EAC} / 100\text{g}$), dichos resultados pudieran diferir al presente estudio debido a las condiciones climáticas de México comparadas con Colombia y de su origen botánico.

Por otro lado, los resultados identificados en las muestras de miel analizadas (MC TGO; $6.68 \pm 0.02 \text{ mg EAC} / 100\text{g}$, MO TGO; $14.00 \pm 0.00 \text{ mg EAC} / 100\text{g}$, MC ME; $33.58 \pm 0.34 \text{ mg EAC} / 100\text{g}$ y MO ME; $30.01 \pm 0.30 \text{ mg EAC} / 100\text{g}$) (Figura 10), se hallaron semejantes a mieles de Bangladesh en 2018, al evidenciar valores que oscilaron entre 8.24 - 111.48 mg

EAC/100g (198). Por otro lado, una investigación previa en Hidalgo, en mieles de Tasquillo, Huehuetla y Acaxochitlán, evidenció una actividad antirradical de 23.44 ± 0.80 , 7.34 ± 0.41 y 14.81 ± 0.48 mg EAC/100g, respectivamente (199). Lo anterior refleja que la MC TGO fue similar a la miel de Tasquillo, MO TGO a la de Acaxochitlán y las mieles de Mérida (MC ME y MO ME), a la de Tasquillo. Mientras que en mieles hidalguenses de Acaxochitlán y Tasquillo, se informaron valores de 54.2 y 58.25 mg EAC/100; respectivamente (200), las diferencia entre las muestras pudo estar influenciado por el origen botánico del néctar así como de la temporada de recolección, factores ambientales como la humedad, temperatura y la composición del suelo (201).

Finalmente, para las muestras de polen las muestras provenientes de Tulancingo y Mérida (PO TGO: 1507.53 ± 0.00 mg EAG/100g y PO ME: 1237.35 ± 9.95 mg EAC/100g), manifestaron un actividad antioxidante mayor con respecto a las muestras de polen de Lituania, con 647 mg ET/100g (178), la variabilidad en las cifras pudieran deberse al reactivo utilizado para la realización de la curva patrón.

8.2.2.3 Actividad antioxidante por FRAP

El ensayo de FRAP, es un método empleado para medir el poder reductor en muestras de plasma, sin embargo, también se ha adaptado y utilizado para el ensayo de antioxidantes en productos alimenticios y se considera la actividad antioxidante de una muestra como una medida de su capacidad reductora Fe^{+3} (202). La figura 11 muestra las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los productos de la colmena.

Con respecto a las muestras de miel de Tulancingo, se pudo observar que los resultados encontrados fueron semejantes a los reportados por Ruiz-Navajas en el 2011, en Tabasco, México, en mieles uniflorales y multiflorales (203). La muestra de MO TGO (157.58 ± 1.44 mmol Fe^{+2}), arrojó una actividad antioxidante similar a las mieles multiflorales, mientras que la MC TGO y MC ME (82.54 ± 0.72 mmol Fe^{+2} y 229.43 ± 0.001 mmol Fe^{+2} , respectivamente), fueron similares a las mieles uniflorales.

Los valores observados en el presente documento para las mieles, también resultaron parecidos a los descritos en un estudio realizado por Álvarez –Suárez (2010), en mieles

uniflorales originarias de cuba de diferentes variedades (vid navideña, gloria de la mañana, vid de lino y frijol cantante) (65).

En cuanto a las muestras de polen de Tulancingo y Mérida, ambas difieren a lo informado por Dos Santos-Vasconcelos (2017). Los resultados pudieron ser diferentes a causa de las unidades utilizadas para expresar los resultados, ya que en este trabajo se expresaron como mmol Fe^{+2} y Dos Santos en mg EAG/g (197), la variación en sus componentes también puede deberse a que las propiedades del polen se ven influenciadas por su origen botánico, las condiciones del suelo, clima y tiempo de cosecha creando un factor adicional al momento del análisis de los resultados (197).

Por último, en relación a la jalea real para JR TGO y JR ME fueron contrastadas con 2 estudios: uno realizado por Balkanska y colaboradores en el 2017, el cual obtuvo valores similares (350 mmol Fe^{+2} /100g) (204), a los de JR TGO (370.91±1.44 mmol Fe^{+2} /100g), y otro llevado a cabo por Pavel en el 2014 en Rumania en donde compararon la jalea real local y comercial (220 mmol Fe^{+2} /100g y 183 mmol Fe^{+2} /100g, respectivamente) (205), siendo ambos mayores a los hallados en la JR ME. Los diferentes resultados pueden ser dependiente de la edad de la larvas que estén consumiendo la jalea real, así como del tiempo de recolección después de la transferencia de las larvas a la colmena (24,48, 72 horas) (188).

8.2.2.4 Actividad quelante

La terapia de quelación en el medio clínico ha sido propuesta para la eliminación de metales pesados en el cuerpo, así como la disminución en la producción de radicales libres, de tal modo que el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) constituye una alternativa para la determinación de actividad quelante (206,207).

La actividad quelante se refiere a la capacidad de un compuesto formar complejos con iones metálicos; nutricionalmente hablando es de suma importancia que los iones de hierro, cobre, cromo, se encuentren quelados en el organismo ya que, de no ser así, experimentan reacciones redox que poseen la capacidad de producir radicales libres. Los principales mecanismos para causar toxicidad por metales pesados incluyen: la alteración de la homeostasis de la actividad antioxidante/ pro-oxidante (208,209).

Todas las muestras presentaron actividad quelante en menor o mayor medida, como se describió anteriormente en la Figura 12, en donde el PO TGO tuvo los valores más altos para esta propiedad, con un porcentaje de $68.27 \pm 0.05\%$. Kao y colaboradores (2011) observaron en muestras de polen de Taiwán, una relación dependiente de la cantidad de muestra, así como del tipo de extracción, de modo tal que al disolverlo en agua caliente, agua fría, etanol al 50% y etanol al 95%, a diferentes concentraciones (2-16 mg/mL), concluyeron que la extracción al 50% de etanol, mostró una mayor actividad quelante, la cual osciló entre 50-75% (210), siendo parecido a la obtenida en la este documento para el PO TGO.

Por otra parte, las muestras de miel evaluadas evidenciaron una actividad quelante mayor (MC TGO 58.72 ± 0.03 ; MO TGO 60.14 ± 0.15 , MC ME 28.17 ± 0.01 y MO ME 27.92 ± 1.72), a la referida por Nse-Ita en 2011 (Nigeria), ya que en dicha investigación se exhibió un rango menor al 10%, tomando como referencia el EDTA (211), por lo tanto, las muestras analizadas de Hidalgo y Mérida, manifiestan una mayor capacidad para generar complejos con iones metálicos.

Con respecto al propóleo de Tulancingo y Mérida, la actividad quelante fue de $28.17 \pm 0.01\%$ y $16.73 \pm 0.95\%$, respectivamente (Figura 13). Un estudio realizado en Portugal refirió un porcentaje variable en el rango de 23.91-50.36%, para aquel recolectado en primavera y un intervalo de 32.53-64.52% de invierno (212), realizando la extracción con etanol, el disolvente más comúnmente utilizado para la extracción de propóleos es el etanol (particularmente a una concentración de 70-75%) (188), este mismo procedimiento fue llevado a cabo en el presente trabajo (1 g de muestra en 30 mL de etanol al 70%), por lo que se esperaba que los resultados fueran semejantes, sin embargo, la composición química del propóleo está íntimamente relacionada a la biodiversidad de la flora, región geográfica, clima donde se recolecta (213,214).

8.3 Formulación y microbiología del alimento de diseño y comparación de las propiedades fisicoquímicas y funcionales entre el producto Mérida y el formulado.

8.3.1 Evaluación sensorial

La evaluación sensorial surge como disciplina para medir la calidad de los alimentos, para conocer la opinión y mejorar la aceptación de los productos por parte del consumidor,

además no solamente se tiene en cuenta para el mejoramiento y optimización de los productos alimenticios existentes, sino también para realizar investigaciones en la elaboración e innovación de nuevos productos, en el aseguramiento de la calidad para su promoción y venta (215).

La figura 13 muestra los puntajes de la evaluación sensorial obtenidos para cada fórmula (producto Mérida y alimento de diseño) y atributo evaluado.

8.3.1.1 Color

Una característica del tipo organoléptica asociada a la calidad de la miel, es el color, el cual tiene que ver con su aspecto que permite juzgarla; este parámetro generalmente se relaciona con la madurez, origen botánico y geográfico (216). Los valores obtenidos oscilaron entre 5.83 y 6.13 puntos (*nivel de agrado de ni me gusta ni me disgusta y me gusta ligeramente*), siendo la número 90 aquella con el puntaje menor y la 48 con el puntaje más alto, esto se puede deber a que la fórmula 90 contenía menor cantidad de miel clara igual al 11%, en comparación a un 16% presente en la fórmula 48, mismo que le pudo otorgar un color más tenue o menos brillante y por ende los panelistas la identificaron con un menor grado de aceptación para este atributo.

8.3.1.2 Olor

El olor es la cualidad de una sustancia que afecta olfato y pertenece a los sentidos químicos, puesto que reacciona solamente por estímulos. Algunas clases de compuestos orgánicos responsables de olores en alimentos, son los ésteres, ácidos y aldehídos volátiles (217). El olor de la miel depende en gran medida del origen floral debido a las sustancias orgánica volátiles que le añade cada néctar, así como el grado de antigüedad de la misma, el polen por su lado presenta olor de resina, paja y miel y el propóleo un olor balsámico (218–220). Los resultados para éste parámetro fluctuaron entre 5.63-6.07, refiriéndolos de acuerdo a la escala hedónica en un nivel de agrado entre “*no me gusta ni me disgusta*” y “*me gusta ligeramente*”. El Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (2014), sugiere que el problema general del análisis de aroma, es la desproporción existente entre las sensaciones y el vocabulario utilizable de los panelistas, que dificultan la comunicación sutil de las diferencias percibidas entre tratamientos o productos (221).

Para este procedimiento se utilizaron diversas proporciones de miel clara y oscura, en combinación con polen, jalea real y propóleo, sin embargo, la poca diferencia en el puntaje para este atributo pudiera ser explicado por la combinación múltiple de olores que cada ingrediente le añadía, mismo que originó en cierta forma una dificultad para discernir cual tenía mejor olor, no obstante, la fórmula 90 mostró los valores más bajos, la cual al compararla con la fórmula 48 que tuvo el mayor puntaje de agrado, se encontró que ambas contenían la misma proporción de polen, jalea y propóleo (*ver anexos*) pero diferente cantidad de miel clara y oscura por lo que la variación en cuanto al nivel de agrado para dicho parámetro fue dependiente de la cantidad de miel clara y miel oscura utilizada.

8.3.1.3 Sabor

El sentido del gusto hace referencia a los sabores en los alimento, y es una característica percibida por la lengua (215,216). Los valores obtenidos para esta característica variaron de 5.10-6.10, determinándose de igual forma con un nivel de agrado de no me agrada ni me desagrada a me gusta ligeramente, siendo la fórmula 58 la que correspondió el valor más bajo para este criterio, de donde la cantidad utilizada de cada ingrediente, se encontró que ésta contenía un 2% menos de propóleo, 1% más de polen, 2% menos de miel clara y 3% de miel más de miel oscura en comparación con la muestra 48, la cual tuvo el mayor nivel de agrado para sabor, contrario a lo que se esperaba, los panelistas no encontraron desagrado en el producto cuando este contenía mayor cantidad de propóleo en extracto, pero sí una diferencia notable cuando la cantidad de miel oscura se elevaba.

Arrabal (2000), menciona que el sabor de la miel varía en función del tipo de flor, de la región geográfica y del clima, así como de la presencia de ácido glucónico, sin embargo no debe de estar presente en gran cantidad debido a que le puede originar un sabor ácido (222), por lo cual se puede deducir que los ácidos orgánicos en cada una de las muestras y en especial en las mieles al ser parte mayoritaria del producto, se consideran determinantes en el sabor de las formulaciones.

8.3.1.4 Consistencia

Este atributo se refiere la evaluación de las características mecánicas (dureza, cohesión, viscosidad), y geométricas (arenosidad, granulosidad, fibroso), así como el orden en el cual éstos se presentan desde que se prueba, se deglute o mastica (18). Los panelistas

refirieron esta propiedad con el nivel de agrado de “ni me gusta ni me disgusta a me gusta ligeramente”, traducido en puntajes estos oscilaron de 5.40 a 6.10, de donde el puntaje menor correspondió a la fórmula 58, esto pudo deberse a un aumento en la viscosidad provocada por un menor contenido de propóleo en extracto (5%) y un mayor contenido de miel oscura (53%). Por lo cual se podría afirmar que los panelistas prefirieron una consistencia menos viscosa, o con una textura más suave, como en la fórmula 48, la cual fue la de mayor nivel de agrado al contener 7% de propóleo en extracto y 50% de miel oscura.

8.3.1.5 Aceptación general

De acuerdo con Costell (2001), la aceptación general es el resultado de la interacción de los atributos físicos y organolépticos del alimento y el estado de salud, fisiológico y psicológico del consumidor en un momento determinado (223). En la escala sensorial las 6 formulaciones fueron calificadas con una valoración de 5.13 (ni me gusta, ni me disgusta) a 6.00, la mezcla de 50% miel clara, 16% miel oscura, 25% polen, 2% jalea real y 7% propóleo fue la más aceptada. Esta preferencia por parte de los panelistas puede deberse a las características de textura, dulzura, acidez y color que le otorgó cada uno de los ingredientes, lo cual hizo ser identificada como aquella con mayor aceptabilidad, relacionado simultáneamente a que también fue la mejor calificada para la mayoría de los atributos, como se mencionó anteriormente.

8.3.2 Propiedades fisicoquímicas del producto Mérida y formulado

8.3.2.1 pH

Como se mencionó anteriormente, hubo diferencias significativas para este parámetro en las formulaciones (Tabla 7), correspondiendo el valor más bajo al producto formulado (alimento de diseño) y pudo deberse a que su componente mayoritario fue miel oscura (en 50%, con un pH de 3.82, por lo tanto, al combinarse con el resto de los ingredientes, originó que se mantuviera este nivel de acidez.

Por otro lado, Carrero-Castillo en 2016 evaluó el pH de una mezcla con 90% de miel de abeja y 10% jalea real, reportó un valor de 4.50, siendo similar al encontrado en el producto de Mérida (219).

8.3.2.2 Sólidos solubles

De acuerdo con Murillo (2015), a mayor contenido de humedad, menos °Brix (130), ello pudiera explicar que en el alimento de diseño se encontró un total de 71 ± 1.15 en comparación con 76 ± 0.00 de la muestra de Mérida (Tabla 4). Es decir, que el alimento de diseño al contener propóleo en extracto, el cual contenía alcohol de caña y jalea real, la cual tiene una humedad del 67%, ambos ingredientes le confirieron al producto mayor humedad y por lo tanto generó una disminución en el contenido de sólidos solubles.

8.3.2.3 Viscosidad

Con respecto a la viscosidad, se puede observar en la figura 14 ambas muestras que ambas muestras tuvieron un comportamiento newtoniano similar, sin embargo, el alimento de diseño tuvo una menor resistencia a fluir conforme la velocidad de corte aumentaba, este efecto, pudo ser originado por un mayor porcentaje de humedad, en la muestra y a la adición de propóleo en extracto y jalea real.

8.3.3 Microbiología del producto formulado

Los resultados anteriormente descritos demuestran que el producto formulado, es inocuo, con un bajo contenido de mesófilos aerobios y esporas, así como una ausencia de enterobacterias, este comportamiento pudo tener su origen en las características fisicoquímicas del producto como el pH y la elevada viscosidad. Los ácidos orgánicos de la miel conforman aproximadamente el 0.5% de su composición, los cuales influyen favorablemente en el sabor y en la estabilidad que presenta frente a microorganismos (224).

Otros autores también refieren que el efecto antiséptico en la miel se debe a su fuente floral y por otro lado la osmolaridad que presenta la miel, creando un ambiente capaz de inhibir microorganismos patógenos, por lo que la proporción alta de miel en el producto (un 50% de miel oscura y 16% miel clara; 66% total), le proporcionó cierto efecto inhibitorio contra el crecimiento bacteriano y de esporas (225).

8.3.4 Contenido de antioxidantes del producto Mérida y formulado

8.3.4.1 Betalaínas (betaninas y betaxantinas)

Los valores obtenidos para betaninas reflejaron un contenido mayor cuando la muestra se encontró en extracción acuosa, correspondiendo el valor más alto al producto formulado (FORM TGO AC), con 2.25 ± 0.00 mg EB/100g (Figura 15). Gandía-Herrero (2016) menciona que las betalaínas (las cuales incluyen a las betaninas y betaxantinas), son compuestos solubles en agua (226), hecho que puede explicar que el valor más alto fuera se encontrara en la FORM TGO AC, además de contener más productos de la colmena en comparación con la FORM ME AC.

Los resultados obtenidos en la FORM TGO AC fueron semejantes con los reportados por Albano 2015, en el cual se evaluó el contenido de betaninas de dos variedades de tuna, siendo la tuna naranja la que mostró un contenido de 3.6 ± 0.9 mg EB/100g (227).

Respecto a las betaxantinas, el valor más alto se halló en la FORM TGO AC (Figura 16), en donde de igual forma pudo deberse a que las betaxantinas son solubles en agua (226). Los valores obtenidos para todas las muestras (Figura 18), exhibieron un contenido menor a los de Fernández-López (2018), el cual determinó este compuesto en variedades de tunas originarias de España (27.5 ± 1.6 mg EI/100 g).

Así mismo, algunos estudios *in vivo* han determinado la actividad biológica de estos compuestos atribuyéndole un efecto supresor en la producción de ácidos grasos de cadena corta en modelos de ratas dislipidémicas, así como responsables de la reducción de colesterol, triglicéridos y un aumento de HDL en un modelo de ratas diabéticas (228,229).

8.3.4.2 Fenoles totales

Como se detalló anteriormente en la figura 17, la extracción acuosa orgánica arrojó valores mayores de fenoles para ambas muestras en comparación con la extracción acuosa, sin embargo, el contenido mayor se identificó en la FORM TGO AO (550.29 ± 15.72 mg EAG/100 g). Existen pocas evidencias sobre la cuantificación de fenoles en miel mezclada con otros productos. Juszczak y colaboradores en el 2016 evaluaron el contenido de fenoles en muestras de miel complementada con polen, miel con propóleo y miel con jalea real

(84.22 ± 23.84 , 114.82 ± 42.5 y 39.88 ± 7.11 mg EAG/100, respectivamente) (230), por lo que el contenido fue menor al referido en este documento.

Se han analizado el contenido de fenoles de mieles mezcladas con otros productos, como en miel con ciruela adicionada en diferentes proporciones, indicando que este aumentaba a medida que incrementaba la cantidad de ciruela añadida, identificando un aporte máximo de 41.64 mg EAG/100 g (231), estas cifras fueron menores a los hallados el presente trabajo.

Ćetkovic (2014), añadió chabacano seco a la miel, la muestra que contenía un 40% de chabacano, mostró un incremento significativo de fenoles de 23.96 ± 1.92 a 102.87 ± 4.82 mg EAG/100 g (232), estos valores fueron también menores a los reportados en esta investigación.

Finalmente, se ha establecido que la ingesta regular de fenoles se asocia con una mejoría significativa sobre los efectos adversos de varias enfermedades como cáncer, diabetes, alteraciones hepáticas, cardiovasculares, entre otros (233), debiéndose a la presencia compuestos bioactivos específicos considerados dentro de la gama de fenoles, como lo son los compuestos fenólicos y flavonoides, mismos que se han identificado en los productos de la colmena, por ejemplo, en el caso de la miel se puede encontrar apigenina, luteolina, kaempferol, miricetina, quercetina (234), en el propóleo por su parte se ha identificado ácido cafeico, cumárico, ferúlico kaempferol, apigenina y crisina (235).

8.3.4.3 Ácido ascórbico

Comparando los resultados por tipo de extracción para cada muestra, se pudo observar en la Figura 18 que los valores más altos correspondieron a la extracción acuosa orgánica. Debido a que no existen evidencias científicas donde determinen ácido ascórbico en una mezcla de miel con otros productos, los resultados fueron contrastados con los hallados por Khalil, 2012 en muestras de miel de Malasia identificando una concentración de 15.1-29.5 mg EAC/100g (236), siendo similares a los obtenidos en la FORM TGO AC y la FORM ME AC (28.38 ± 0.17 mg EAC/100g y 26.56 ± 0.17 mg EAC/100g, respectivamente) y menores a la FORM TGO AO y FORM ME AO (258.58 ± 1.74 mg EAC/100g y 286.86 ± 4.62 mg EAC/100g, respectivamente).

Otra publicación similar en miel llevado a cabo en Arabia Saudita en el 2019, por Al-Mosa y colaboradores identificó un contenido de 239.2-260.4 mg EAC/100g, los cuales fueron semejantes a la FORM TGO AO y la FORM ME AO.

La determinación de este compuesto toma importancia en base a el papel que juega en el mantenimiento del equilibrio de la reducción de óxido (redox), así como el probable efecto que pueda tener en el tratamiento de enfermedades crónicas, autoinmunes y cáncer (237). Además Aljadi y Kamaruddin (2004), establecen que la capacidad antioxidante de la miel está fuertemente correlacionada con el contenido fenólico total en relación con la cantidad de vitaminas C y E (238). Por tanto, la actividad biológica del alimento de diseño se la estaría aportando el contenido de ácido ascórbico, su alta proporción de miel (tanto oscura como clara) y la presencia de polen el cual en base a los resultados previamente expuestos en la Figura 10.

8.3.5 Actividad antioxidante y quelante del producto Mérida y formulado

8.3.5.1 Actividad antioxidante por DPPH^{•+}

Tal como se describió en la Figura 19, el producto formulado presentó la mayor actividad antiradical cuando se extrajo en medio acuoso orgánico (FORM TGO AO), expresada en $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ (Figura 20). No obstante, al convertir los valores a porcentaje de inhibición, el más alto se manifestó en la FORM TGO AC ($61.68 \pm 0.70\%$), el cual fue 27.6% mayor al observado en una mezcla de miel complementada con polen y 39.29% mayor al de una mezcla de miel con polen, ambos analizados por Juszczak y colaboradores en el 2016 (230).

Mahmoud y colaboradores (2017), evaluaron la actividad antioxidante por DPPH^{•+} en una mezcla de ciruela pasa, zanahoria, grosella, cáscara de granada, zumaque, achicoria, miel de maíz, soya y vitaminas (B_{12} , C y D), hallando un porcentaje de inhibición de $66.77 \pm 3.04\%$, cuando se encontraba en extracción metanólica (239), siendo semejante a la FORM TGO AC ($61.68 \pm 0.70\%$).

Por último, los valores obtenidos para la FORM TGO AO ($1385.66 \pm 27.53\ \mu\text{mol ET}/100\text{g}$), fueron mayores a los referidos por Chen y colaboradores en el 2014 en muestras de naranja ($966\ \mu\text{mol ET}/100\text{g}$) y pera ($648\ \mu\text{mol ET}/100\text{g}$) (240), y menores por lo

consiguiente para el resto de las muestras (FORM ME AO: 315.66 ± 40.72 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$, FORM TGO AC: 219.90 ± 2.5 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$, FORM ME AC: 162.90 ± 2.5 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$).

8.3.5.2 Actividad antioxidante por ABTS $\bullet^+$

La mayor actividad antioxidante por este método, se identificó en el alimento de diseño en la extracción acuosa orgánica (FORM TGO AO) con 45.81 ± 1.90 $\mu\text{mol EAC}$ (Figura 20). Existe poca evidencia sobre la determinación de actividad antirradical en mezclas de alimentos. No obstante, el comportamiento con respecto al porcentaje de inhibición, arrojó valores menores para todas las muestras en comparación con las observadas por Kennas y colaboradores (2018), en muestras de yogur complementado con miel y cáscara de granada, los cuales contenían una proporción de granada de 2.5 al 10% y 2.5 al 5% de miel (241).

Por otro lado, en base a los resultados reportados por Juszczak (2016), en una mezcla miel con jalea real ($14.87 \pm 3.40\%$ de inhibición) (230), fueron similares a los encontrados en la FORM TGO AO y FORM ME AO ($16.83 \pm 0.68\%$ y $10.42 \pm 0.68\%$, respectivamente).

Finalmente, el porcentaje de inhibición, para el alimento de diseño y el producto Mérida en ambos tipos de extracción, fueron menores a los mostrados por Nguyen y Hwang en 2016, en una mezcla de yogur y una baya nativa de America del Norte y Europa llamada aronia en proporciones de 1 a 3%, evidenciando un rango promedio de 59.98-70.90% (242), en comparación con el rango hallado en este documento el cual fue de 10.42-29.27%.

8.3.5.3 Actividad antioxidante por FRAP

El poder reductor de las formulaciones medido por el método de FRAP, exhibió los valores mayores en la FORM TGO AO (41.25 ± 0.52 $\mu\text{mol Fe (II)} / 100 \text{ g}$), de acuerdo con la Figura 21.

Este resultado fue menor a lo reportado por Juszczak y colaboradores (2016), el cual observó una actividad antioxidante de 232.31 ± 71.1452 $\mu\text{mol Fe (II)} / 100 \text{ g}$, en una mezcla de miel con jalea real adicionada (230).

De igual forma, de acuerdo con Singh (2016), los resultados para todas las muestras (FORM TGO AO: 41.25 ± 0.52 $\mu\text{mol Fe (II)} / 100 \text{ g}$, FORM ME AO: 21.59 $\mu\text{mol Fe (II)} /$

100 g, FORM TGO AC: 10.64 ± 0.02 $\mu\text{mol Fe (II)} / 100 \text{ g}$, FORM ME AC: 7.25 ± 0.03 $\mu\text{mol Fe (II)} / 100 \text{ g}$), fueron menores a los identificados en muestras de melón, en el cual se reportaron valores en el rango de 115-386 1452 $\mu\text{mol Fe (II)} / 100 \text{ g}$ (243). Guo y colaboradores en 2003, identificó la actividad antioxidante de FRAP en muestras de pulpa de mango, manifestando 380 $\mu\text{mol Fe (II)} / 100\text{g}$ (244), siendo menor a lo hallado en todas las muestras en este trabajo.

8.3.5.4 Actividad quelante

Con respecto a la capacidad de quelación de iones ferrosos, debido a que no existe evidencia sobre la evaluación de la actividad quelante de productos similares al alimento de diseño formulado, los resultados (Figura 22). Aloqbi (2016), determinó esta característica en muestras de jugo de granada obteniendo un rango de 14-18% (245), siendo similar a lo hallado en la FORM TGO AO ($19.89 \pm 0.13\%$) y menor al resto de las muestras.

Por otra parte, la FORM TGO AC con $50.51 \pm 0.30\%$ y la FORM ME AC con $46.60 \pm 0.55\%$, manifestaron un comportamiento similar al observado por Kim en el 2018, en mora azul ($52.47 \pm 0.75\%$) y arándano ($47.60 \pm 0.39\%$) (246). No obstante, aunque el alimento de diseño en comparación con el producto de Mérida contenía mayor diversidad de productos apiarios, ambos tuvieron valores muy cercanos entre sí en la extracción acuosa, lo cual puede estar explicado por los ingredientes que compartían que fueron la miel y el polen, por lo que se puede concluir que la actividad quelante en ambas muestras dependió en gran parte por la presencia de estos dos productos de la colmena en este tipo de extracción (acuosa).

En adición, Viuda-Martos y colaboradores en el 2013 en España describieron una actividad quelante en muestras de jugo de granada en un rango entre 2.47-47.04% (247), por lo que la FORM TGO AO, FORM ME AO y FORM ME AC, se hallaron dentro del rango.

Se ha evidenciado que los ácidos tienen propiedades quelantes de iones metálicos, los cuales son catalizadores de reacciones indeseables en los alimentos como decoloración, rancidez, pérdida de nutrientes. Consecuentemente, los ácidos orgánicos mejoran la protección producida por antioxidantes (248), uno de ellos es el ácido glucónico, el cual está presente en los productos de la colmena y especialmente en la miel hasta en 1%, en solución acuosa y a pH neutro forma el ion gluconato mismo que le ha conferido diversas aplicaciones

en el industria alimentaria, como un componente de agentes leudantes en productos horneados y en la reducción de la absorción de grasa en donas (249). Dentro de las aplicaciones en la salud, se distingue su utilización para tratar la deficiencia nutricional de calcio (gluconato de calcio), en la profilaxis de la anemia por deficiencia de hierro en forma de gluconato y fosfogluconato de hierro y como ingrediente para el tratamiento del resfriado común y para las enfermedades causadas por deficiencias de zinc, como la maduración sexual retrasada, el letargo mental y la susceptibilidad a las infecciones (gluconato de zinc) (250).

Otro agente quelante y aglutinante de metales, es el ácido cítrico, el cual es un ácido débil que es empleado en primera instancia para mejorar la asimilación de los micronutrientes en las plantas y hablando de la salud humana ha sido utilizado para aumentar la biodisponibilidad del hierro en el organismo, debido a su capacidad para reducir el hierro no Hem, mantener su solubilidad a pH alto y por tanto aumentar la cantidad de hierro soluble en el intestino, dando como resultado una opción de profilaxis combinada para los estados de anemia por deficiencia de hierro (251,252).

En conclusión, los productos de la colmena al formar parte del alimento de diseño y al ser fuentes de ácido glucónico y ácido cítrico, le confieren la capacidad de generar complejos con actividad quelante para diversos metales que se requieren para mantener un correcto estado de salud, por lo que se esperaba que, al probar este producto en humanos a partir de futuras investigaciones, se confirmen los supuestos teóricos de esta propiedad.

IX. CONCLUSIONES

La jalea real, las mieles (clara y oscura) y el propóleo son las muestras con el mayor porcentaje de humedad, hidratos de carbono y grasa, respectivamente; mientras que la mayor proporción para cenizas y proteína correspondió al polen. En cuanto a la presencia de hidroximetilfurfural, los valores obtenidos refieren que es apta para consumo humano, esto de acuerdo a los parámetros establecidos por la NMX-F-036-1997. Por otro lado, la miel clara fue la muestra con la mayor viscosidad.

A través del análisis microbiológico, se verificó la inocuidad de las muestras, evidenciando que los productos de la colmena analizados tienen buenas prácticas de higiene durante su procesamiento y obtención.

El propóleo de Tulancingo es el producto apiario con mayor valor funcional, al exhibir los valores más altos de betaxantinas, fenoles totales y actividad antioxidante por DPPH⁺.

La evaluación sensorial de las formulaciones, resultó ser un parámetro clave para conocer las propiedades sensoriales de las formulaciones, siendo la que contiene 50% de miel oscura, 25% de polen, 16% de miel clara, 7% de propóleo y 2% de jalea real, la cual manifestó el mayor nivel de agrado hacia los consumidores, consolidándose como el alimento de diseño.

El alimento de diseño formulado, mostró un comportamiento reológico similar al del producto el Mérida, no obstante, el contenido de sólidos solubles totales fue mayor significativamente en el alimento de diseño. En base al análisis microbiológico del alimento de diseño, el producto es inocuo ya que muestra ausencia de enterobacterias y baja concentración de mesófilos aerobios y esporas. En relación a la determinación del contenido de antioxidantes y actividad antioxidante, el alimento de diseño en extracción acuosa orgánica es la muestra que cuenta con los valores más altos para contenido de fenoles, DPPH⁺, ABTS⁺ y actividad quelante.

En base a los resultados mencionados anteriormente, el alimento de diseño puede considerarse como un producto con alto valor nutricional y contenido de antioxidantes, por

lo que el fomentar su consumo como parte de la alimentación del mexicano, pudiera contribuir a la prevención y tratamiento de diversas enfermedades.

X. RECOMENDACIONES

Un análisis más profundo sobre las propiedades de los productos de la colmena y del alimento de diseño permitirá el establecimiento conciso de su funcionalidad en la salud humana, por tanto, se propone considerar los siguientes análisis:

- ❖ Identificación de compuestos bioactivos (fenoles y ácidos fenólicos) por HPLC de las muestras (miel clara, miel oscura, polen, jalea y propóleo) y en el producto formulado.
- ❖ Evaluación de la bio-disponibilidad de los antioxidantes del alimento de diseño, a través de un modelo *in vitro* de digestión.
- ❖ Estudio de la modificación de las propiedades fisicoquímicas y funcionales del alimento de diseño durante un período de almacenamiento.
- ❖ Estimación de la toxicidad del producto formulado, por medio de un modelo animal con la finalidad de conocer los posibles riesgos para población sobre su consumo

XI. REFERENCIAS

1. Cornara L, Biagi M, Xiao J, Burlando B. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. *Front Pharmacol*. 2017;8:1–20.
2. Nates Parra G. Genética del comportamiento: abejas como modelo. *Acta Biológica Colomb*. 2011;16(3):213–29.
3. Vicente Rubiano M. Análisis virológico y epidemiológico del síndrome de despoblamiento de las colmenas en España: estudio de causas y consecuencias [Internet]. Universidad Complutense de Madrid; 2016.
4. Jean-Prost P, Conte L. Apicultura: conocimiento de la abeja y manejo de la colmena. 4ta ed. España: Mundi Prensa; 2007. 48–60 p.
5. Barillas Santos ME. Programa de Documentación de casos de éxito IICA-COFUPRO 2010. Fundación Hidalgo Produce A.C. Hidalgo, México; 2010.
6. Magaña Magaña MÁ, Sanginés García JR, Lara y Lara PE, Salazar Barrientosa L de L, Leyva Morales CE. Competitiveness and participation of Mexican honey in the world market. *Rev Mex Cienc Pecu*. 2017;8(1):43.
7. Magaña MAM, Cortés MET, Salazar LL, Sanginés JR. Productivity beekeeping in Mexico and its impact on profitability. *Rev Mex Ciencias Agrícolas*. 2016;7:1103–15.
8. Franchetti de Paula M, Juazeiro dos Santos A, Timofeicszyk Junior R, Afonso Hoeflich V, Garzel Leodoro da Silva JC, Angelo H. Análise da competitividade das exportações brasileiras de mel natural, segundo o modelo constant market share e o índice de vantagem comparativa revelada. *RevCeres*. 2016;63(5):614–20.
9. Soto Muciño LE, Elizarraras Baena R, Soto Muciño I. Situación apícola en México y perspectiva de la producción de miel en el estado de Veracruz. *Rev Estrategias del Desarro Empres*. 2017;3(7):40–64.
10. FAO-SAGARPA. Diagnóstico del sector rural y pesquero en México. México; 2011.
11. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Atlas Agroalimentario 2012-2018. México: 1ra Edición; 2018. p. 222.
12. FAOSTAT. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2016.
13. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Anuario estadístico de la producción ganadera. México; 2018 [cited 2019 Mar 18].
14. INEGI. Anuario estadístico. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México; 2010. Available from: <http://www.inegi.org.mx>

15. Baroni M, Nores M, Díaz M, Chiabrando G, Fassano J, Costa C, et al. Determination of volatile organic compound patterns characteristics of five unifloral honeys by solid-phase microextraction—Gas chromatography-mass spectrometry coupled to chemometrics. *J Agric Food Chem.* 2006;54:7235–41.
16. Marchini L, Moreti AC de CC, Otsuk I, Sodré G. Physicochemical composition of *Apis mellifera* honey samples from sao Paulo state, Brazil. *Quim Nova.* 2007;30(7):1653–7.
17. Álvarez Suárez JM, Tulipani S, Romandini S, Bertoli E, Battino M. Contribution of honey in nutrition and human health: A review. *Med J Nutrition Metab.* 2010;3(1):15–23.
18. Caamal Cauich J. Comparación de la calidad de la miel (*Apis mellífera*) entre las zonas apícola de Saltillo, Coahuila y Bolonchén de Rejón, Campeche. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2009.
19. Muñoz O, Peña RC, Ureta E, Montenegro G, Timmermann BN. Propolis from Chilean matorral hives. *J Biosci.* 2001;56(3–4):269–72.
20. Kaur R, Kumar NR, Harjai K. Phytochemical analysis of different extracts of bee pollen. *Int J Pharm Biol Res.* 2013;4(3):65–8.
21. Nicolson SW. Bee Food: The chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *African Zool.* 2011;46(2):197–204.
22. Sun C, Wu Z, Wang Z, Zhang H. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2015;2015:1–9.
23. Huang S, Zhang C-P, Wang K, Li G, Hu F-L. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules.* 2014;19:19610–32.
24. Peña RC. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *CienInvAgr.* 2008;35(1):17–26.
25. Alencar SM, Oldoni TLC, Castro ML, Cabral ISR, Costa-Neto CM, Cury JA, et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *J Ethnopharmacol.* 2007;113:278–83.
26. Campo Fernández M, Cuesta Rubio O, Rosado Perez A, Montes De Oca Porto R, Hernández Márquez I, Piccinelli AL, et al. GC-MS determination of isoflavonoids in seven red cuban propolis samples. *J Agric Food Chem.* 2008;56(21):9927–32.
27. Maciejewicz W. Isolation of flavonoid aglycones from propolis by a column chromatography method and their identification by GC-MS and TLC methods. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2001;24(8):1171–9.
28. Bonvehí JS, Lacalle Gutiérrez A. Antioxidant activity and total phenolics of propolis

- from the Basque Country (Northeastern Spain). *J Am Oil Chem Soc.* 2011;88:1387–95.
29. Cvek J, Medic-Saric M, Vitali D, Vedrinar-Dragojevic I, Smit Z, Tomić S. The content of essential and toxic elements in Croatian propolis samples and their tinctures. *J Apic Res.* 2008;47(1):35–45.
 30. Isidorov VA, Czyzewska U, Isidorova AG, Bakier S. Gas chromatographic and mass spectrometric characterization of the organic acids extracted from some preparations containing lyophilized royal jelly. *J Chromatogr B.* 2009;877(29):3776–80.
 31. Srisuparbh D, Klinbunga S, Wongsiri S, Sittipraneed S. Isolation and characterization of major royal jelly cDNAs and proteins of the honey bee (*Apis cerana*). *J Biochem Mol Biol.* 2003;36(6):572–9.
 32. Ramadan MF, Al-Ghamdi A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *J Funct Foods [Internet].* 2012;4(1):39–52.
 33. Sanatini AG, Marcazzan GL, Caboni MF, Bogdanov S, De Almedia-Muradian LB. Quality and standardisation of royal jelly. *J ApiProduct ApiMedical Sci.* 2009;1(1):1–6.
 34. Chen C, Chen S-Y. Changes in protein components and storage stability of royal jelly under various conditions. *Food Chem.* 1995;54(2):195–200.
 35. Simuth J. Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Apidologie.* 2001;32:69–80.
 36. Guo H, Kouzuma Y, Yonekura M. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. *Food Chem.* 2009;113(1):238–45.
 37. Terada Y, Narukawa M, Watanabe T. Specific hydroxy fatty acids in Royal Jelly activate TRPA1. *J Agric Food Chem.* 2011;59:2627–35.
 38. Stocker A, Schramel P, Kettrup A, Bengsch E. Trace and mineral elements in royal jelly and homeostatic effects. *J Trace Elem Med Biol.* 2005;19:183–9.
 39. Ashwell M. Conceptos sobre los alimentos funcionales. ILSI Europe concise Monograph series. 2002. 40 p.
 40. Olagniero G, Genevois C, Irei V, Marcenado J, Bendersky S. Alimentos funcionales: conceptos, definiciones y marco legal global. 2007;25(October):31–9.
 41. Astiasarán Anchia I, Lasheras Aldar B, Ariño Plana A, Martínez Hernández J. Alimentos y nutrición en la práctica sanitaria. 1ra Ed. España, Madrid: Díaz de Santos; 2003.
 42. Manjula K, Suneetha C. Designer Foods-Their Role in Preventing Lifestyle Disorders. *Int J Sci Nat.* 2011;2(4):878–82.

43. Al-Waili NS, Salom K, Butler G, Al Ghamdi AA. Honey and microbial infections: A review supporting the use of honey for microbial control. *J Med Food*. 2011;14(10):1079–96.
44. Ajibola A, Chamunorwa JP, Erlwanger KH. Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. *Nutr Metab*. 2012;9:61.
45. Tenore GC, Ritieni A, Campiglia P, Novellino E. Nutraceutical potential of monofloral honeys produced by the sicilian black honeybees (*Apis mellifera* ssp. *sicula*). *Food Chem Toxicol*. 2012;50(6):1955–61.
46. Rao PV, Krishnan KT, Salleh N, Hua Gan S. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: A comparative review. *Brazilian J Pharmacogn*. 2016;26:657–64.
47. Mărgăoan R, Zăhan M, Mărghitaș LA, Dezmiorean DS, Erler S, Bobiș O. Antiproliferative activity and apoptotic effects of *Filipendula ulmaria* pollen against C26 mice colon tumour cells. *J Apic Sci*. 2016;60(1):135–44.
48. Erejuwa O, Sulaiman S, Wahab M, Sirajudeen K, Salleh M, Gurtu S. Antioxidant protection of Malaysian tualang honey in pancreas of normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Ann Endocrinol*. 2010;71:291–6.
49. Erejuwa O, Sulaiman S, Wahab M, Sirajudeen K, Salleh M, Gurtu S. Hepatoprotective effect of tualang honey supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Appl Res Nat Prod*. 2011;4(4):37–41.
50. Mobasser M, Ghiyasvand S, Ostadrahimi A, Ghojzadeh M, Pourmoradian S. Effect of fresh royal jelly ingestion on glycemic response in patients with type 2 diabetes. 2015;17(9):e20074.
51. Shidfar F, Jazayeri S, Mousavi SN, Malek M, Hosseini AF, Khoshpey B. Does supplementation with royal jelly improve oxidative stress and insulin resistance in type 2 diabetic patients? *Iran J Public Heal*. 2015;44(6):797–803.
52. Abdulrhman M, El Hefnawy M, Ali R, Abdel Hamid I, Abou El-Goud A, Refai D. Effects of honey, sucrose and glucose on blood glucose and C-peptide in patients with type 1 diabetes mellitus. *Complement Ther Clin Pract* 2013;19(1):15–9.
53. Yamaguchi M, Hamamoto R, Uchiyama S, Ishiyama K, Hashimoto K. Preventive effects of bee pollen *cistus ladaniferus* extract on bone loss in streptozotocin-diabetic rats in vivo. *J Heal Sci*. 2007;53(2):190–5.
54. Guo H, Saiga A, Sato M, Miyazawa I, Shibata M, Takahata Y, et al. Royal jelly supplementation improves lipoprotein metabolism in humans. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2007;53:345–8.
55. Morita H, Ikeda T, Kajita K, Fujioka K, Mori I, Okada H, et al. Effect of royal jelly ingestion for six months on healthy volunteers. *Nutr J*. 2012;11:1–7.

56. Li Y, Chen M, Xuan H, Hu F. Effects of encapsulated propolis on blood glycemic control, lipid metabolism, and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus rats. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2012;2012:1–8.
57. Alyane M, Benguedouar L, Kebsa W, Boussenane HN, Rouibah H, Lahouel M. Cardioprotective effects and mechanism of action of polyphenols extracted from propolis against doxorubicin toxicity. *Pak J Pharm Sci.* 2008;21(3):201–9.
58. Yaghoobi N, Al-Waili N, Ghayour-Mobarhan M, Parizadeh S, Abasalti Z, Yaghoobi Z, et al. Natural honey and cardiovascular risk factors; effects on blood glucose, cholesterol, triacylglycerole, CRP and body weight compared with sucrose. *Scienitific World J.* 2008;8:463–9.
59. Zhu W, Chen M, Shou Q, Li Y, Hu F. Biological activities of Chinese propolis and brazilian propolis on streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in rats. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2011;2011:1–8.
60. Aslan Z, Aksoy L. Anti-inflammatory effects of royal jelly on ethylene glycol induced renal inflammation in rats. *Int Braz J Urol.* 2015;41(5):1008–13.
61. Pajovic B, Radojevic N, Dimitrovski A, Tomovic S, Vukovic M. The therapeutic potential of royal jelly in benign prostatic hyperplasia. Comparison with contemporary literature. *Aging Male.* 2016;19(3):192–6.
62. Maruyama H, Sakamoto T, Araki Y, Hara H. Anti-inflammatory effect of bee pollen ethanol extract from *Cistus* sp. of spanish on carrageenan-induced rat hind paw edema. *BMC Complement Altern Med.* 2010;10(1):30.
63. Suzuki KM, Isohama Y, Maruyama H, Yamada Y, Narita Y, Ohta S, et al. Estrogenic activities of fatty acids and a sterol isolated from royal jelly. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2008;5(3):295–302.
64. Joksimovic A, Stankovic D, Joksimovic I, Molnar S, Joksimovic S. Royal jelly as a supplement for young football players. *Sport Sci.* 2009;2(1):62–7.
65. Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Díaz D, Estevez Y, Romandini S, Giampieri F, et al. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(8–9):2490–9.
66. Boselli Emanuele, Caboni Maria, Sabatini Anna, Marcazzan Gian LG. Determination and changes of free amino acids in royal elly during storage. *Apidologie* 2003;34(2):129–37.
67. Kirk R, Sawyer R, Egan H. *Composición y análisis de alimentos de Pearson.* 2da Ed. México: Ed.Continental; 1996. 10–34 p.
68. AOAC. *Official Methods of Analysis of AOAC International.* 18th Ed. Gaithersburg, E.U.U; 2005.

69. AOAC International, Latimer GW. Official methods of analysis of AOAC International. 19th Ed. Gatherstoung, E.U.U; 2012. 2 v. (en paginación múltiple).
70. Caravaca Rodríguez F, Castel Genís J, Guzmán Guerrero J, Delgado Pertíñez M, Mena Guerrero Y, Alcalde Aldea M, et al. Bases de la producción animal. 1ra reimpr. España: Universidad de Sevilla; 2003. 252 p.
71. NORMEX. NMX-F-317-2013. Alimentos determinación de pH en alimentos y bebidas no alcohólicas. Método potenciométrico-Método de prueba. México: DOF(Diario Oficial de la Federación); 2013.
72. NORMEX. NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos. Mexico: DOF (Diario oficial de la Federación); 1978.
73. NORMEX. NMX-F-102-2010. Alimentos determinación de acidez titulable en alimentos. Método de ensayo (prueba). Mexico: DOF (Diario oficial de la Federación); 2010.
74. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th Ed. Gatherstoung, E.U.U; 1999.
75. NORMEX. NMX-F-103-2009 Alimentos. Determinación de grados Brix en alimentos y bebidas. Método de Ensayo (Prueba). Mexico: DOF (Diario oficial de la Federación); 2009.
76. Subosky M, Sosa López A, Castillo A, Cano N. Evaluación del contenido de hidroximetilfurfural en mieles del nordeste argentino. Agrotecnia. 2004;12(3400):32–3.
77. NORMEX. NMX-F-036-1997. Alimentos-Miel-Especificaciones y métodos de prueba. México: DOF (Diario Oficial de la Nación); 1997.
78. Ramírez Navas J. Introducción a la reología de los alimentos. 1a edición. Colombia: Universidad del Valle; 2006. 17 p.
79. Pascual Anderson M del R, Calderón Pascual V. Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. 2da Ed. España, Madrid: Diaz de Santos; 2000. 13 p.
80. Cicco N, Lanorte MT, Paraggio M, Viggiano M, Lattanzio V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. Microchem J. 2009;91(1):107–10.
81. Huang D, Boxin OU, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J Agric Food Chem. 2005;53(6):1841–56.
82. Stintzing FC, Herbach KM, Mosshammer MR, Carle R, Yi W, Sellappan S, et al. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. J Agric Food Chem. 2005;53(2):442–51.

83. Greenfield H, Southgate D. Datos de composición de alimentos: obtención, gestión y utilización. 2da Ed. Reino Unido: FAO; 2003. 147 p.
84. Dürüst N, Sümengen D, Dürüst Y. Ascorbic acid and element contents of food of trabzon (Turkey). *J Agric Food Chem*. 1997;8561(96):2085–7.
85. Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH- assay: A critical review and results. *Food Chem*. 2012;130(4):1036–43.
86. Morales FJ, Jiménez-Pérez S. Free radical scavenging capacity of maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chem*. 2001;72:119–25.
87. Roginsky V, Lissi EA. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem*. 2005;92(2):235–54.
88. Kukoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Macini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos 1. *Cienc TecnolAliment*. 2005;25(4):726–32.
89. Bahr Valcárcel P, Basulto Lemus Y. El Potencial Reductor Férrico (FRAP). Un ensayo para evaluar la capacidad antioxidante en suero. *CCM*. 2004;8(4).
90. Pérez-Jiménez J, Arranz S, Tabernero M, Díaz- Rubio ME, Serrano J, Goñi I, et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Res Int*. 2008;41(3):274–85.
91. Bello Gutiérrez J, López De Cereain Salsamendi A. Fundamentos de ciencia toxicológica. 1ra Ed. España: Díaz de Santos; 2001. 49 p.
92. Gulcin İ, Buyukokuroglu ME, Kufrevioglu OI. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *J Pineal Res*. 2003;34(4):278–81.
93. Espinosa Manfugás J. Evaluación sensorial de los alimentos. Habana, Cuba: Editorial Universitaria; 2007. 129 p.
94. Lawless H, Hildegarde H. Sensory Evaluation of food flavors: principles and practices. 2da Edició. New York: Springer; 2010. 596 p.
95. Ramírez Navas JS. Análisis sensorial: pruebas orientadas al consumidor. Vol. 12, Reciteia. 2012. 91–92 p.
96. Bello J. Ciencia Bromatológica. Principios generales de los alimentos. España, Madrid: Ediciones Diaz de Santos; 2000.
97. Adetuyi FO, Ibrahim TA, Ogundahunsi GA. Total phenol, tocopherol and antibacterial quality of honey *Apis mellifera* sold in Owo community, Ondo State, Nigeria. 2009;8(7):1305–9.

98. El Sohaimy SA, Masry SHD, Shehata MG. Physicochemical characteristics of honey from different origins. *Ann Agric Sci.* 2015;60(2):279–87.
99. Codex Alimentarius Commission. Codex Standard for Honey, FAO. Allinorm 1. 2001;19–26.
100. Salamanca Grosso G, Hernández JA, Monica PO, Gómez MN. Propiedades fisicoquímicas y estándares de calidad de la jalea real de dos linajes de abejas *Apis mellifera* (Hymenoptera: apidae). *SciELO.* 2009;1–4.
101. Norma-IRAM. Normas IRAM-INTA 15935: Propóleos y sus extractos. Argentina: Instituto Argentino De Normalización; 2000.
102. Omafuvbe BO, Akanbi OO. Microbiological and physico-chemical properties of some commercial Nigerian honey. *African J Microbiol Res.* 2009;3(12):891–6.
103. Fuenmayor B C, Zuluaga D C, Díaz M C, Quicazán de C M, Cosio M, Mannino S. Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen. *RevMVZ Córdoba.* 2014;19(1):4003–14.
104. Kalaycıoğlu Z, Kaygusuz H, Döker S, Kolaylı S, Erim FB. Characterization of Turkish honeybee pollens by principal component analysis based on their individual organic acids, sugars, minerals, and antioxidant activities. *LWT - Food Sci Technol.* 2017;84:402–8.
105. Kubiliene L, Laugaliene V, Pavilonis A, Maruska A, Majiene D, Barauskaite K, et al. Alternative preparation of propolis extracts: Comparison of their composition and biological activities. *BMC Complement Altern Med.* 2015;15(1):1–7.
106. Ministério da Agricultura P e A, (MAPA). Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. Brazil: Diário Oficial [da]República Federativa do Brasil.; 2001. p. 18–23.
107. Garcia-Amoedo LH, Oliveira KCLS, Pamplona LC, Almeida-Muradian LB de, Azedo RAB. Physicochemical analyses indicated to the quality control of royal jelly with honey. *CiêncTecnolAliment.* 2004;24(4):608–12.
108. Bogdanov S. Royal jelly, bee brood: Composition, health, medicine: a review. *Bee Prod Sci.* 2017;1–41.
109. Ferioli F, Armaforte E, Caboni MF. Comparison of the lipid content, fatty acid profile and sterol composition in local Italian and commercial royal jelly samples. *JAOCS, J Am Oil Chem Soc.* 2014;91(6):875–84.
110. Mohamed AAR, Galal AAA, Elewa YHA. Comparative protective effects of royal jelly and cod liver oil against neurotoxic impact of tartrazine on male rat pups brain. *Acta Histochem.* 2015;117(7):649–58.

111. Vucevic D, Melliou E, Vasilijic S, Gasic S, Ivanovski P, Chinou I, et al. Fatty acids isolated from royal jelly modulate dendritic cell-mediated immune response in vitro. *Int Immunopharmacol.* 2007;7(9):1211–20.
112. Manzo LP, De-Faria FM, Dunder RJ, Rabelo-Socca EA, Consonni SR, De Almeida ACA, et al. Royal jelly and its dual role in TNBS colitis in mice. *Sci World J.* 2015;2015.
113. Feas X, Vazquez-Tato MP, Estevinho L, Seijas JA, Iglesias A. Organic bee pollen: Botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules.* 2012;17(7):8359–77.
114. Almeida-Muradian LB, Pamplona LC, Coimbra S, Barth OM. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *J Food Compos Anal.* 2005;18(1):105–11.
115. Kostić AT, Barać MB, Stanojević SP, Milojković-Opsenica DM, Tešić ŽL, Šikoparija B, et al. Physicochemical composition and techno-functional properties of bee pollen collected in Serbia. *LWT - Food Sci Technol.* 2015;62(1):301–9.
116. Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Kazmierczak J, Mencner L, Olczyk K. Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. *Evidence-Based Complement Altern.* 2015;2015:1–6.
117. Subramanian R, Hebbar HU, Rastogi NK. Processing of honey: A review. *Int J Food Prop.* 2007;10(1):127–43.
118. Özbacı B, Boyacı IH, Topcu A, Kadilar C, Tamer U. Rapid analysis of sugars in honey by processing Raman spectrum using chemometric methods and artificial neural networks. *Food Chem.* 2013;136(3–4):1444–52.
119. Bertoneclj J, Pucihar T, Borov AK. Carbohydrate composition of Slovenian bee pollens. *Int J Food Technol.* 2018;53(8):1–9.
120. Bobiş O, Mărghitaş L Al, Dezmirean D. Quality parameters and nutritional value of different commercial bee products. *Bull UASVM Anim Sci Biotechnol.* 2010;67:91–6.
121. Xue X, Wu L, Wang K. Chemical composition of royal jelly. *Bee-products-Chemical Biol Prop.* 2017;181–90.
122. Terrab A, Díez MJ, Heredia FJ. Characterisation of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chem.* 2002;79(3):373–9.
123. Abda Alla AE-M, El-Sayed Nour M, Attia Ewies M. Factors affecting the physical and chemical characteristics of Egyptian beehoney. 1ra Ed. [Egipto]: Noor Publishing; 2015.
124. Karabagias IK, Badeka A V., Kontakos S, Karabournioti S, Kontominas MG.

- Botanical discrimination of Greek unifloral honeys with physico-chemical and chemometric analyses. *Food Chem.* 2014;165:181–90.
125. Saxena S, Gautam S, Sharma A. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chem.* 2010;118(2):391–7.
 126. Ribeiro RDOR, Mársico ET, Carneiro CDS, Monteiro MLG, Júnior CC, Jesus EFO De. Detection of honey adulteration of high fructose corn syrup by low field nuclear magnetic resonance (LF 1H NMR). *J Food Eng.* 2014;135:39–43.
 127. Balkanska R, Karadjova I, Ignatova M. Comparative analyses of chemical composition of royal jelly and drone brood. *Bulg Chem Commun.* 2014;46(2):412–6.
 128. Rebelo KS, Ferreira AG, Carvalho-Zilse GA. Physicochemical characteristics of pollen collected by Amazonian stingless bees. *Ciência Rural.* 2016;46(5):927–32.
 129. Pereira FMV, Carvalho A de S, Cabeça LF, Colnago LA. Classification of intact fresh plums according to sweetness using time-domain nuclear magnetic resonance and chemometrics. *Microchem J.* 2013;108:14–7.
 130. Murillo Lobo KP. Evaluación del método de descristalizado en las características físicas, químicas y sensoriales de la miel de abeja (*Apis mellifera*). Escuela Agrícola Panamericana; 2015.
 131. Negri LM. El pH y acidez de la leche. In: *Manual de Referencias técnicas para el logro de la leche de calidad*. 2da edición. INTA; 2005. p. 155–61.
 132. Malika N, Mohamed F, Chakib E. Microbiological and physico-chemical properties of Moroccan honey. *Int J Agric Biol.* 2005;50(October):773–6.
 133. Aazza S, Lyoussi B, Antunes D, Miguel MG. Physicochemical characterization and antioxidant activity of 17 commercial Moroccan honeys. *Int J Food Sci Nutr.* 2014;65(4):449–57.
 134. Álvarez Barragán Y, Trama A, Tabera A. Desarrollo de un producto a base de miel con agregado de propóleos. UNCVBPA; 2017.
 135. Viera VB, Piovesan N, Ines K, Moro B, Rodrigues AS, Scapin G, et al. Preparation and microbiological analysis of Tuscan sausage with added propolis extract. *Food Sci Technol.* 2016;36:37–41.
 136. Li X, Huang C, Xue Y. Contribution of Lipids in Honeybee (*Apis mellifera*) Royal Jelly to Health. *J Med Food.* 2013;16(2):96–102.
 137. Sugiyama T, Ta K, Mori H. Royal Jelly Acid , 10-Hydroxy- trans -2-Decenoic Acid , as a Modulator of the Innate Immune Responses. *Bentham Sci Publ.* 2012;12:368–76.
 138. Bílikova K, Huang S-C, Lin P, Simuth J, Peng C-C. Structure and antimicrobial activity relationship of royalisin , an antimicrobial peptide from royal jelly of *Apis*

- mellifera. *Peptides*. 2015;68:190–6.
139. Markowicz D, Monaro E, Siguemoto E, Sefor M. Maillard reaction products in processed food: pros and cons. *Food Ind Process - Methods Equip*. 2012;
 140. Fallico B, Zappalà M, Arena E, Verzera A. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chem*. 2004;85(2):305–13.
 141. Shapla UM, Solayman M, Alam N, Khalil MI, Gan SH. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. *Chem Cent J*. 2018;12(1):1–18.
 142. Brudzynski K, Miotto D. The relationship between the content of Maillard reaction-like products and bioactivity of Canadian honeys. *Food Chem*. 2011;124(3):869–74.
 143. Boonchiangma S, Chanthai S, Srijaranai S, Srijaranai S. Chemical compositions and non-enzymatic browning compounds of Thai honey: a kinetic study. *J Food Process Eng*. 2011;34(2011):1584–96.
 144. Díaz Moreno AC. Influencia de las condiciones de almacenamiento sobre la calidad físico-química y biológica de la miel. Universidad de Zaragoza; 2009.
 145. Council Directive of the European Union. Council Directive 2001/110/EC of 20 december 2001 relating to honey. *J Eur Commun*. 2002;47–52.
 146. Codex Alimentarius. Codex Stan 12-1981. Roma: FAO; 1981. p. 1–9.
 147. Pasias IN, Kiriakou IK, Proestos C. HMF and diastase activity in honeys: A fully validated approach and a chemometric analysis for identification of honey freshness and adulteration. *Food Chem*. 2017;229:425–31.
 148. Juszczak L, Fortuna T. Rheology of selected Polish honeys. *J Food Eng*. 2006;75:43–9.
 149. Draiaia R, Chefrour A, Dainese N, Borin A, Manzinello C, Gallina A, et al. Physicochemical parameters and antibiotics residuals in Algerian honey. *African J Biotechnol*. 2015;14(14):1242–51.
 150. Witczak M, Juszczak L, Gałkowska D. Non-Newtonian behaviour of heather honey. *J Food Eng*. 2011;104(4):532–7.
 151. Smanalieva J, Senge B. Analytical and rheological investigations into selected unifloral German honey. *Eur Food Technol*. 2009;229:107–13.
 152. Leemhuis H, Pijning T, Dobruchowska JM, Van Leeuwen SS, Kralj S, Dijkstra BW, et al. Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism, alfa-glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *J Biotechnol*. 2012.

153. Kothari D, Das D, Patel S, Goyal A, Tripura W, Informatics M, et al. Dextran and food application. *Polysaccharides*. 2014;1–16.
154. Monteiro da Rocha JF. Avaliação do efeito do armazenamento na qualidade do pólen apícola. Instituto Politécnico de Bragança; 2013.
155. Castillo Patiño DL. Efecto del tiempo de secado en las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales del polen de abejas cosechado en El Paraíso, Honduras. Escuela Agrícola Panamericana; 2015.
156. De-Melo AAM, Estevinho MLMF, de Almeida-Muradian LB. A diagnosis of the microbiological quality of dehydrated bee-pollen produced in Brazil. *Lett Appl Microbiol*. 2015;61(5):477–83.
157. Zandamela Mungóí EMF. Caracterización físico-química y evaluación sanitaria de la miel de mozambique. Univ Autònoma Barcelona. 2008;290.
158. Lusby PE, Coombes AL, Wilkinson JM. Bactericidal Activity of Different Honeys against Pathogenic Bacteria. *Arch Med Res*. 2005;36(5):464–7.
159. Manyi-Loh C, Clarke A, Ndip R. An overview of honey: Therapeutic properties and contribution in nutrition and human health. *African J Microbiol Res*. 2011;5(9):844–52.
160. George NM, Cutting KF. Antibacterial Honey (MedihoneyTM): in-vitro Activity Against Clinical Isolates of MRSA, VRE, and Other Multiresistant Gram-negative Organisms Including *Pseudomonas aeruginosa*. *Wounds*. 2007;19(9):231–6.
161. Iurlina MO, Fritz R. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *Int J Food Microbiol*. 2005;105(3):297–304.
162. Aguillón Márquez MA, Hernández C, Correa AR. Caracterización microbiológica en miel de *Apis mellifera* y *Tetragonisca angustula*. 2010;1–3.
163. Delgado Olivares L, Betanzos Cabrera G, Sumaya Martínez MT. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investig Cienc*. 2010;(50):10–5.
164. Fernández López JA, Almela L, Obón JM, Castellar R. Determination of antioxidant constituents in Cactus Pear fruits. *Plants Food Hum Nutr*. 2010;253–9.
165. Sumaya Martínez MT, Cruz Jaime S, Madrigal Santillán E, García Paredes JD, Cariño Cortés R, Cruz Cansino N, et al. Betalain, acid ascorbic, phenolic contents and antioxidant properties of purple, red, yellow and white cactus pears. *Int J Mol Sci*. 2011;12(10):6452–68.
166. Livrea MA, Tesoriere L. Health benefits and bioactive components of the fruit. *J Prof Assoc Cactus Dev*. 2006;8(November):73–90.

167. García-Cruz L, Valle-Guadarrama S, Salinas-Moreno Y, Luna-Morales C del C. Postharvest quality, soluble phenols, betalains content, and antioxidant activity of *Stenocereus pruinosus* and *Stenocereus stellatus* fruit. *Postharvest Biol Technol*. 2016;111:69–76.
168. Ramírez-Ramos M, García-Mateos M del R, Corrales-García J, Ybarra-Moncada C, Castillo-González AM. Compuestos antioxidantes en variedades pigmentadas de tuna (*opuntia* sp.). *Rev Fitotec Mex*. 2015;38(4):349–57.
169. Camacho Romero O, Melgarejo Gómez S, de la Rosa Torres C, Puertas-Mejia MA, Rojano B. Correlación del contenido de fenoles y antocianinas con la capacidad antioxidante *Syzygium cumini* (L.) Skeels, (Jambolan). *Rev Cuba Plantas Med*. 2016;21(1):63–70.
170. Cartaya O, Reynaldo I. Reseña bibliográfica. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultiv Trop*. 2001;22(2):5–14.
171. Socha R, Gałkowska D, Bugaj M, Juszczak L. Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. *Nat Prod Res*. 2015;29(5):416–22.
172. Kedzia B. The chemical composition of polish propolis. Part II. The new study. *Adv Phytother*. 2009;2:122–8.
173. Delgado Aceves MDL, Andrade Ortega JÁ, Ramírez Barragán CA. Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Rev Mex Ciencias For*. 2018;6(28):74–87.
174. Moniruzzaman M, Khalil I, Sulaiman SA, Gan SH. Physicochemical and antioxidant properties of Malaysian honeys produced by. *BMC Complement Altern Med*. 2013;13(43):1–12.
175. Chin NL, Tan SW, Chua LS, Yusof YA, Kek SP. Total phenolic contents and colour intensity of Malaysian honeys from the *Apis* spp. and *Trigona* spp. *Bees. Agric Agric Sci Procedia*. 2014;2:150–5.
176. Kaškonienė V, Venskutonis PR. Floral markers in honey of various botanical and geographic origins: a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2010;9(6):620–34.
177. Uthurry CA, Hevia D, Gomez-Cordoves C. Role of honey polyphenols in health. *J ApiProduct ApiMedical Sci*. 2011;3(4):141–59.
178. Čeksteryte V, Kurtinaitiene B, Venskutonis PR, Pukalskas A, Kazernavičiute R, Balžekas J. Evaluation of antioxidant activity and flavonoid composition in differently preserved bee products. *Czech J Food Sci*. 2016;34(2):133–42.
179. López Gutiérrez N, Aguilera Luiz M del M, Romero González R, Vidal JLM, Garrido Frenich A. Fast analysis of polyphenols in royal jelly products using automated TurboFlowTM-liquid chromatography-Orbitrap high resolution mass spectrometry. *J*

Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci. 2014;973:17–28.

180. Morais M, Moreira L, Feás X, Estevinho LM. Honeybee-collected pollen from five Portuguese natural parks: palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food Chem Toxicol*. 2011;49(5):1096–101.
181. Rzepecka-Stojko A, Stojko J, Kurek-Górecka A, Górecki M, Kabała-Dzik A, Kubina R, et al. Polyphenols from Bee Pollen: Structure, Absorption, Metabolism and Biological Activity. *Molecules*. 2015 Dec 4;20(12):21732–49.
182. Gahler S, Otto K, Böhm V. Alterations of vitamin C, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. *J Agric Food Chem*. 2003;51(27):7962–8.
183. Garrido Frenich A, Hernández Torres M., Belmonte Vega A, Martínez Vidal J., Plaza Bolaños P. Determination of ascorbic acid and carotenoids in food commodities by liquid chromatography with mass spectrometry detection. *J Agric Food Chem*. 2005;53(19):7371–6.
184. Bonta V, Marghitas O, Bobis O, Margaoan R, Barnuiiu L, Dezmirean D. Quantitative determination of vitamin C in honey and bee pollen using HPLC-DAD method. *Bull UASVM Anim Sci Biotechnol*. 2013;70(1):31–6.
185. Oliveira KCLS, Moriya M, Azedo RAB, Farmacêuticas FDC, São U De, Av P, et al. Relationship between botanical origin and antioxidantes vitamins of bee-collected pollen. *QuimNova*. 2009;32(5):1099–102.
186. Pereira de Melo I, Almedia Muradian LB. Stability of antioxidants vitamins in bee pollen samples. *QuimNova*. 2010;33(3):514–8.
187. Guija E, Inocente M, Ponce J, Zarzosa E. Evaluación de la técnica 2 , 2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horiz Med (Barcelona)*. 2015;2(1):0–4.
188. Kocot J, Kiełczykowska M, Luchowska-Kocot D, Kurzepa J, Musik I. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: possible medical application. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:1–29.
189. Chen Y, Wang K, Zhang Y, Zheng Y, Hu F. In Vitro Anti-Inflammatory Effects of Three Fatty Acids from Royal Jelly. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:1–11. /
190. Narimane S, Demircan E, Salah A, Ozcelik BO, Salah R. Correlation between antioxidant activity and phenolic acids profile and content of Algerian propolis: influence of solvent. *Pak J Pharm Sci*. 2017;30(4):1417–23.
191. Kuś PM, Congiu F, Teper D, Sroka Z, Jerković I, Tuberoso CIG. Antioxidant activity, color characteristics, total phenol content and general HPLC fingerprints of six Polish unifloral honey types. *LWT - Food Sci Technol*. 2014;55(1):124–30.

192. Pourreza N. Phenolic compounds as potential antioxidant. *J Nat Pharm Prod*. 2013;8(4):149–50.
193. Pyrzynska K, Pękal A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Anal Methods*. 2013;5(17):4288–95.
194. Marghitas L Al, Dezmirean D, Moise A, Mihai CM, Laslo LS. DPPH Method for Evaluation of Propolis Antioxidant Activity. *Bull UASVM Anim Sci Biotechnol*. 2009;66(1-2):253–8.
195. Palomino LR, García CM, Gil JH, Rojano BA, Durango DL. Determination of phenolic content and evaluation of antioxidant activity of propolis from Antioquia (Colombia). *Rev la Fac Química Farm*. 2009;16(3):388–95.
196. Anand S, Pang E, Livanos G, Mantri N. Characterization of physico-chemical properties and antioxidant capacities of bioactive honey produced from Australian grown agastache rugosa and its correlation with colour and poly-phenol content. *Molecules*. 2018;23(1).
197. Dos Santos Vasconcelos MR, Fernandes Duarte AW, Pereira Gomez E, Chagas da Silva S, Queijeiro López AM. Physicochemical composition and antioxidant potential of bee pollen from different botanical sources in Alagoas , Brazil. *Ciência e Agrotecnologia*. 2017;41(4):447–58.
198. Mukti RF, Chowdhury MMK, Nahid MA, Rahaman MM, Uddin MA. Antibacterial activity and physicochemical properties of florally diversified bangladeshi honeys. *Bangladesh J Microbiol*. 2018;33(1–2):5–9.
199. Suárez Vargas A, Pimentel-González DJ, Quintero-Lira A, Figueira A., Campos-Montiel R. Influencia de la diversidad de polen en la capacidad antioxidante de mieles del estado de Hidalgo. *Boletín Ciencias Agropecu del ICAP*. 2018;1(2).
200. Quintero-Lira A, Ángeles Santos A, Aguirre-Álvarez G, Reyes-Munguía A, Almaraz-Buendía I, Campos-Montiel RG. Effects of liquefying crystallized honey by ultrasound on crystal size, 5-hydroxymethylfurfural, colour, phenolic compounds and antioxidant activity. *Eur Food Res Technol*. 2017;243(4):619–26.
201. Buratti S, Benedetti S, Cosio MS. Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. *Talanta*. 2007;71(3):1387–92.
202. Valenzuela Bustamante PD. Evaluacion de la actividad antioxidante y determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides. Universidad de Chile; 2015.
203. Ruiz-Navajas Y, Viuda-Martos M, Fernández-López J, Zaldivar-Cruz JM, Kuri V, Pérez-Álvarez JÁ. Antioxidant activity of artisanal honey from Tabasco, Mexico. *Int J Food Prop*. 2011;14(2):459–70.

204. Balkanska R, Marghitas L-A, Pavel CI. Antioxidant activity and total polyphenol content of royal jelly from Bulgaria. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2017;6(10):578–85.
205. Pavel CI, Mărghitaş LA, Dezmirean DS, Tomoş LI, Bonta V, Şapcaliu A, et al. Comparison between local and commercial royal jelly use of antioxidant activity and 10-hydroxy-2-decenoic acid as quality parameter. *J Apic Res*. 2014;53(1):116–23.
206. Flora SJS, Pachauri V. Chelation in metal intoxication. *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7(7):2745–88.
207. Mikirova N, Casciari J, Hunninghake R, Riordan N. EDTA chelation therapy in the treatment of toxic metals exposure. *Spat DD*. 2011;1(2):81.
208. González Ponce HA. Estudio de la capacidad antioxidante de la tuna *Opuntia streptacantha* y *Opuntia robusta* en la intoxicación aguda con acetaminofén. Universidad Autónoma de Aguascalientes; 2016.
209. Flora SJS, Mittal M, Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res*. 2008;(October):501–23.
210. Kao YT, Lu MJ, Chen C. Preliminary analyses of phenolic compounds and antioxidant activities in tea pollen extracts. *J Food Drug Anal*. 2011;19(4):470–7.
211. Nse Ita B. Antioxidant activity of honey samples from the southern rainforest and northern savannah ecosystems in Nigeria. *IJPSR*. 2011;2(8):2115–20.
212. Miguel MG, Nunes S, Dandlen S SA, Cavaco AM, Antunes MD. Antioxidant activity of propolis from algarve. *Adv Environ Biol*. 2011;5(2):345–50.
213. López BGC, Schmidt EM, Eberlin MN, Sawaya ACHF. Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chem*. 2014;146:174–80.
214. Gong S, Luo L, Gong W, Gao Y, Xie M. Multivariate analyses of element concentrations revealed the groupings of propolis from different regions in China. *Food Chem*. 2012;134(1):583–8.
215. Hernández Alarcón E. *Análisis Sensorial*. 1ra Edició. Bogotá: Universidad Nacional Abierta y a Distancia; 2005. 128 p.
216. Salamanca Grosso G. Criterios relativos al análisis sensorial de mieles. *Dep Química - Fac Ciencias Básicas*. 2015;1(8).
217. Montenegro G, Gómez M, Pizarro R, Casaubon G, Peña R. Implementación de un panel sensorial para mieles chilenas. *Cienc e Investig Agrar*. 2008;35(1):51–8.
218. López Velásquez JE. Desarrollo de un prototipo de jalea de guayaba (*Psidium guajava*) utilizando miel de abeja. Escuela Agrícola Panamericana; 2012.

219. Carrera Castillo GM. Caracterización fisicoquímica y sensorial de miel de abeja complementada con polen y / o jalea real. Escuela Agrícola Panamericana; 2016.
220. Dias LG, Pereira AP, Estevinho LM. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(12):4246–53.
221. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA). Guía práctica para el control y la evaluación de la calidad de miel y polen. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2014. p. 36.
222. Arrabal M V, Ciappini MC. Aceptabilidad de miel y su correlación con análisis fisicoquímicos. *Galeria Apic virtual*. 2000;3:1–5.
223. Costell E. La aceptabilidad de los alimentos: nutrición y placer. Bases para la aceptación de los alimentos. *Arbor CLXVIII*. 2001;(661):68–70.
224. Estrada H, Gamboa M, Reyes C, Arias M. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. *Arch Latinoam Nutr*. 2005;55(2):167–71.
225. Cabrera L, Céspedes E, Nava R, Ojeda G. Actividad antibacteriana peróxido de mieles zulianas. *Rev Científica FCV-LUZ*. 2006;XVI(5):556–553.
226. Gandía-Herrero F, Escribano J, García-Carmona F. Biological activities of plant pigments betalains. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016;56(6):937–45.
227. Albano C, Negro C, Tommasi N, Gerardi C, Mita G, Miceli A, et al. Betalains, phenols and antioxidant capacity in cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] Fruits from apulia (South Italy) genotypes. *Antioxidants*. 2015;4(2):269–80.
228. Wroblewska M, Juskiewicz J, Wiczowski W. Physiological properties of beetroot crisps applied in standard and dyslipidaemic diets of rats. *Lipids Health Dis*. 2011;10(1):178.
229. Clemente A., Desai P V. Evaluation of the hematological, hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant properties of *Amaranthus Tricolor* leaf extract in rat. *Trop J Pharm Res*. 2011;10(5):595–602.
230. Juszczak L, Gałkowska D, Ostrowska M, Socha R. Antioxidant activity of honey supplemented with bee products. *Nat Prod Res*. 2016;30(12):1436–9.
231. Tumbas VT, Vulić JJ, Čanadanović-Brunet JM, Djilas SM, Četković GS, Stajčić SS, et al. Antioxidant and sensorial properties of acacia honey supplemented with prunes. *Acta Period Technol*. 2012;43:293–304.
232. Četković G, Čanadanović-Brunet J, Vulić J, Djilas S, Šaponjac VT. Antioxidant and sensorial properties of linden honey with dried apricots. *Chem Biodivers*.

2014;11(11):1861–70.

233. Graf BA, Milbury PE, Blumberg JB. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *J Med Food*. 2005;8(3):281–90.
234. Hossen MS, Ali MY, Jahurul MHA, Abdel-Daim MM, Gan SH, Khalil MI. Beneficial roles of honey polyphenols against some human degenerative diseases: A review. *Pharmacol Reports*. 2017;69(6):1194–205.
235. Kumazawa S, Ahn MR, Fujimoto T, Kato M. Radical-scavenging activity and phenolic constituents of propolis from different regions of Argentina. *Nat Prod Res*. 2010;24(9):804–12.
236. Khalil MI, Moniruzzaman M, Boukraâ L, Benhanifia M, Islam MA, Islam MN, et al. Physicochemical and antioxidant properties of algerian honey. *Molecules*. 2012;17(9):11199–215.
237. Figueroa-Méndez R, Rivas-Arancibia S. Vitamin C in health and disease: Its role in the metabolism of cells and redox state in the brain. *Front Physiol*. 2015;6(DEC):1–11.
238. Aljadi AM, Kamaruddin MY. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chem*. 2004;85(4):513–8.
239. Mahmoud MH, Wahba HMA, Mahmoud MH, Badawy IH. Newly formulated antioxidant rich dietary supplement in jelly form for alleviation of liver diseases in rats. *J Biol Sci*. 2017;17(7):334–46.
240. Chen GL, Chen SG, Zhao YY, Luo CX, Li J, Gao YQ. Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after in vitro digestion. *Ind Crops Prod*. 2014;57:150–7.
241. Kennas A, Amellal-Chibane H, Kessal F, Halladj F. Effect of pomegranate peel and honey fortification on physicochemical, physical, microbiological and antioxidant properties of yoghurt powder. *J Saudi Soc Agric Sci*. 2018;
242. Nguyen L, Hwang ES. Quality characteristics and antioxidant activity of yogurt supplemented with aronia (*aronia melanocarpa*) juice. *Prev Nutr Food Sci*. 2016;21(4):330–7.
243. Singh J, Singh V, Shukla S, K Rai A. Phenolic content and cucurbit antioxidant capacity of selected fruits extracted with different solvents. *J Nutr Food Sci*. 2016;06(06).
244. Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J, Jiang Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutr Res*. 2003;23(12):1719–26.
245. Aloqbi A, Omar U, Yousr M, Grace M, Lila MA, Howell N. Antioxidant Activity of

- Pomegranate Juice and Punicalagin. *Nat Sci*. 2016;08(06):235–46.
246. Kim JS. Antioxidant activities of selected berries and their free, esterified, and insoluble-bound phenolic acid contents. *Prev Nutr Food Sci*. 2018;23(1):35–45.
 247. Viuda-Martos M, Pérez-Álvarez JA, Sendra E, Fernández-López J. In vitro antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum*) peel powder extract obtained as coproduct in the juice extraction process. *J Food Process Preserv*. 2013;37(5):772–6.
 248. Max B, Salgado JM, Rodríguez N, Cortés S, Converti A, Domínguez JM. Biotechnological production of citric acid. *Brazilian J Microbiol*. 2010;41:862–75.
 249. Kaushik P. Use of natural organic and synthetic chelating agents for efficient phytoremediation. *Int J Enhanc Res Sci Technol Eng*. 2015;4(6):2319–746399.
 250. Ramachandran S, Fontanille P, Pandey A, Larroche C. Gluconic acid: Properties, applications and microbial production. *Food Technol Biotechnol*. 2006;44(2):185–95.
 251. Muñoz A. Ácido Cítrico: Compuesto Interesante. *Rev Científica la Univ Autónoma Coahuila*. 2014;6(12):18–23.
 252. Gaitán C D, Olivares G M, Arredondo O M, Pizarro A F. Biodisponibilidad de hierro en humanos. *Rev Chil Nutr*. 2006;33(2).

XII. ANEXOS

Anexo 1. Distribución de ingredientes en formulación A1, cubriendo 15% de la recomendación de fenoles, expresados en mg EAG

FORMULACIÓN A1	Nombre de la muestra	Cantidad de muestra /100g	mg EAG	mg EAG /30 g
	Miel oscura (g)	53	27.76	8.32
	Miel clara (g)	14	5.31	1.59
	Polen (g)	26	411.80	123.54
	Jalea real (g)	2	7.78	2.33
	Propóleo (ml)	5	49.04	14.71
			Total	150.51
			% Recomendación	15.05

Anexo 2. Distribución de ingredientes en formulación A2, cubriendo 15% de la recomendación de fenoles, expresados en mg EAG

FORMULACIÓN A2	Nombre de la muestra	Cantidad de muestra/100g	mg EAG	mg EAG/30 g
	Miel oscura (g)	47	24.62	7.38
	Miel clara (g)	19	7.21	2.16
	Polen (g)	26	411.80	123.54
	Jalea real (g)	2	7.78	2.33
	Propóleo (ml)	6	58.85	17.65
				mg
			% Recomendación	15.30

Anexo 3. Distribución de ingredientes en formulación A3, cubriendo 15% de la recomendación de fenoles, expresados en mg EAG

	Nombre de la muestra	Cantidad de muestra/100g	mg EAG	mg EAG/30 g
FORMULACIÓN A3	Miel oscura (g)	55	28.81	8.64
	Miel clara (g)	13	4.93	1.48
	Polen (g)	28	443.48	133.04
	Jalea real (g)	2	7.78	2.33
	Propóleo (ml)	2	19.61	5.88
			mg	151.39
			% Recomendación	15.139

Anexo 4. Distribución de ingredientes en formulación A2, cubriendo 15% de la recomendación de fenoles, expresados en mg EAG

	Nombre de la muestra	Cantidad de muestra/100g	mg EAG	mg EAG/30 g
FORMULACIÓN A4	Miel oscura (g)	50	26.19	7.85
	Miel clara (g)	16	6.07	1.82
	Polen (g)	25	395.96	118.79
	Jalea real (g)	2	7.78	2.33
	Propóleo (ml)	7	68.66	20.59
			mg	151.40
			% Recomendación	15.14

Anexo 5. Distribución de ingredientes en formulación A5, cubriendo 15% de la recomendación de fenoles, expresados en EAG/Equivalentes de Ácido Gálico

	Nombre de la muestra	Cantidad de muestra/100g	mg EAG	mg EAG/30 g
FORMULACIÓN A5	Miel oscura (g)	45	23.57	7.07
	Miel clara (g)	22	8.35	2.50
	Polen (g)	26	411.80	123.54
	Jalea real (g)	2	7.78	2.33
	Propóleo (ml)	5	49.04	14.71
			mg	150.17
			% Recomendación	15.01

Anexo 6. Distribución de ingredientes en formulación A6, cubriendo 15% de la recomendación de fenoles, expresados en EAG/Equivalentes de Ácido Gálico

	Nombre de la muestra	Cantidad de muestra/100g	mg EAG	mg EAG/30 g
FORMULACIÓN A6	Miel oscura (g)	55	28.81	8.64
	Miel clara (g)	11	4.17	1.25
	Polen (g)	25	395.96	118.79
	Jalea real (g)	2	7.78	2.33
	Propóleo (ml)	5	68.66	20.59
			mg	151.62
			% Recomendación	15.16

ANEXO 7. Formato de prueba sensorial (Parte 1)

Elaborado por: L.N. Gloria Isabel Camacho Bernal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias de Salud

Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Prueba hedónica de producto

Nombre:

Fecha:

Edad:

Instrucciones: Describa su agrado con respecto a cada atributo de la muestra proporcionada, colocando el código de la muestra en cada escala, según lo considere.

Códigos de las muestras (de izquierda a derecha): 58, 90,16, 05,22, 48

COLOR



OLOR



SABOR



ANEXO 8. Formato de prueba sensorial (Parte 2)

Elaborado por: L.N. Gloria Isabel Camacho Bernal

CONSISTENCIA



ACEPTACIÓN GENERAL



Comentarios generales:

¡Muchas gracias!