



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

TESIS DOCTORAL

**EFECTO DE LA FERMENTACIÓN DE *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS*
EN LAS PROPIEDADES FUNCIONALES EN MIEL DE
SCAPTORIGONA MEXICANA.**

Para obtener el grado de
Doctora en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA

M. Ana Karen Zaldivar Ortega

Director (a)

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez

Codirector (a)

Dr. Antonio de Jesús Cenobio Galindo

Tulancingo de Bravo, Hgo., México, 16 de enero de 2026.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

TESIS DOCTORAL

EFECTO DE LA FERMENTACIÓN DE *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* EN LAS PROPIEDADES FUNCIONALES EN MIEL DE *SCAPTOTRIGONA MEXICANA*.

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA

M. Ana Karen Zaldivar Ortega

Director (a)

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez

Codirector (a)

Dr. Antonio de Jesús Cenobio Galindo

Asesores

Dr. Juan Carlos Ángeles Hernández

Dra. Nuria Morfin Ramírez

Tulancingo de Bravo, Hgo., México, 16 de enero de 2026.

19705/2026

Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar
Presente

El Comité Tutorial de la **TESIS** del programa educativo de posgrado titulado “**Efecto de la fermentación de *Lactobacillus rhamnosus* en las propiedades funcionales en miel de *Scaptotrigona mexicana***” realizado por la sustentante **M.C. Ana Karen Zaldivar Ortega** con número de cuenta **195380** perteneciente al programa de **Doctorado en Ciencias Agropecuarias (Tradicional)**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que la sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente

“Amor, Orden y Progreso”

Tulancingo, Hidalgo a 16 de enero de 2026

El Comité Tutorial



Dr. Gabriel Aguirre Álvarez



Dr. Antonio de Jesús Cenobio Galindo



Dr. Juan Carlos Ángeles Hernández



Dra. Nuria Morfin Ramírez

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, actualmente SECIHTI, sin el apoyo económico otorgado nada de esto hubiera sido posible.

A mí, por tanto esfuerzo, paciencia, trabajo, porque a pesar de la adversidad logré mucho más de lo que nunca imaginé, estoy orgullosa de la persona y profesional en la que me convertí.

A mis padres, Rosa María y Raúl, gracias por ser mi raíz y mi mayor ejemplo de perseverancia, trabajo y fortaleza. Su amor incondicional, su apoyo constante y cada sacrificio realizado han sido el motor que me ha impulsado a no rendirme y a seguir adelante incluso en los momentos más difíciles. Este logro también es suyo.

A mis hermanos, Bryan y Eduardo, gracias por su cariño, sus consejos y por estar siempre presentes. Su apoyo y complicidad han hecho de este camino una experiencia más ligera, recordándome que la vida también se disfruta en medio de los retos.

A Olaf, por acompañarme fielmente en mis noches de desvelo, por su compañía silenciosa y su amor incondicional, que tantas veces fue el alivio necesario para continuar.

A mis amigos, especialmente a Omar, gracias por estar conmigo en los momentos más complejos de este trayecto. Tu apoyo, comprensión y amistad genuina significaron más de lo que las palabras pueden expresar, gracias por todo.

A mi director, el Dr. Antonio, mi más profundo agradecimiento y admiración. Sin su guía, paciencia y apoyo, concluir esta etapa no habría sido posible. Gracias por su integridad, por su ejemplo y por creer en este trabajo incluso cuando el camino parecía incierto.

A la Dra. Iridiam, colega y amiga, gracias por tu sororidad, tu amistad sincera y tu acompañamiento constante. Tu apoyo fue un sostén importante a lo largo de este proceso, te admiro por esa integridad que pocos tienen.

Al Dr. Juan Carlos, gracias por brindarme una oportunidad sin conocerme previamente y por todo su apoyo incondicional en momentos particularmente difíciles. Su amistad, confianza y mentoría han sido fundamentales en mi formación y crecimiento personal.

Al Dr. Gabriel, gracias por confiar en mí, por abrirme las puertas y permitirme crecer académica y profesionalmente, respaldando mis decisiones y alentándome a creer en mis capacidades.

A Dra. Nuria Morfin por su apoyo y ser motivo de inspiración en este trabajo.

Finalmente, a quienes estuvieron presentes en este camino y que, por distintas circunstancias de la vida, hoy ya no están. De manera especial al Dr. Rafael Campos, por su guía y consejos. A pesar de múltiples dificultades, se lograron todos los objetivos planteados, y este trabajo representa también un paso más hacia la tercera publicación, se que estaría orgulloso.

RESUMEN

En la actualidad, la salud pública ha orientado sus estrategias hacia la prevención de enfermedades crónico-degenerativas desde un enfoque positivo, priorizando la inclusión de alimentos con efectos benéficos que contribuyan a la prevención de enfermedades, impulsando el desarrollo y consumo de alimentos funcionales. Estos se definen como aquellos que, además de su valor nutricional, ejercen efectos favorables sobre funciones específicas del organismo y pueden reducir el riesgo de diversas patologías. Entre estos destacan los alimentos fermentados con probióticos, los cuales han demostrado mejorar funciones fisiológicas relevantes. La miel de abejas sin aguijón es considerada un alimento funcional debido a su compleja composición química; sin embargo, su elevado contenido de azúcares simples, principalmente fructosa y glucosa, puede contrarrestar sus efectos positivos si se consume en exceso, ya que se ha asociado con obesidad, enfermedades cardiovasculares, estrés oxidativo y otros trastornos metabólicos. En México, además de la miel producida por *Apis mellifera*, se obtiene miel de abejas sin aguijón, entre las que destaca *Scaptotrigona mexicana*, especie utilizada desde épocas precolombinas y aún cultivada en diversas regiones del país. Su miel posee relevancia cultural, económica y ecológica, además de reconocidos atributos terapéuticos.

Estudios previos han demostrado que la miel de *S. mexicana* difiere significativamente de la miel de *A. mellifera* en sus parámetros fisicoquímicos, destacando su alto contenido de humedad y actividad de agua, lo que la hace susceptible a procesos de fermentación. Estas características, junto con su contenido de monosacáridos, aminoácidos, vitaminas y minerales, la convierten en un sustrato adecuado para el crecimiento de microorganismos benéficos. No obstante, la falta de regulación específica y de estudios sistemáticos ha limitado su posicionamiento en el mercado.

Ante el creciente interés por alimentos funcionales, la fermentación con probióticos surge como una estrategia innovadora para potenciar sus propiedades. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo analizar las propiedades fisicoquímicas de la miel de *S. mexicana* y evaluar el efecto de la adición de *Lactobacillus rhamnosus* sobre su viabilidad, los cambios en su composición química y la generación de compuestos bioactivos.

ABSTRACT

Currently, public health strategies are focused on the prevention of chronic degenerative diseases from a positive approach, prioritizing the inclusion of foods with beneficial health effects rather than dietary restrictions. This change has increased consumer interest in more nutritious foods that contribute to disease prevention, driving the development and consumption of functional foods. These are defined as foods that, in addition to their nutritional value, have favorable effects on specific bodily functions and can reduce the risk of various diseases. Among these are fermented foods with probiotics, which have been shown to improve relevant physiological functions.

Honey from stingless bees are considered a functional food due to its complex chemical composition; however, its high content of simple sugars, mainly fructose and glucose, can counteract its positive effects if consumed in excess, as it has been associated with obesity, cardiovascular disease, oxidative stress, and other metabolic disorders. In Mexico, in addition to honey produced by *Apis mellifera*, honey is obtained from stingless bees, notably *Scaptotrigona mexicana*, a species used since pre-Columbian times and still cultivated in various regions of the country. Its honey has cultural, economic, and ecological relevance, as well as recognized therapeutic attributes.

Previous studies have shown that *S. mexicana* honey differs significantly from *A. mellifera* honey in its physicochemical parameters, notably its high moisture content and water activity, which makes it susceptible to fermentation processes. These characteristics, together with its content of monosaccharides, amino acids, vitamins, and minerals, make it a suitable substrate for the growth of beneficial microorganisms. However, the lack of specific regulation and systematic studies has limited its positioning in the market.

Given the growing interest in functional foods, fermentation with probiotics is emerging as an innovative strategy to enhance their properties. In this context, the present study aimed to analyze the physicochemical properties of *S. mexicana* honey and evaluate the effect of adding *Lactobacillus rhamnosus* on its viability, changes in its chemical composition, and the generation of bioactive compounds.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.3. JUSTIFICACIÓN	5
1.4. ANTECEDENTES	7
2. MARCO TEÓRICO	10
2.2. Miel.....	10
2.1.1. Antecedentes históricos	10
2.1.2. Definición.	10
2.1.3. Elaboración	11
2.1.4. Tipos de miel.....	11
2.1.5. Composición química	12
2.1.5.1. Hidratos de carbono	12
2.1.5.2. Azúcares reductores.....	13
2.1.5.3. Agua.....	14
2.1.5.4. Compuestos nitrogenados.....	14
2.1.5.5. Ácidos orgánicos	15
2.1.5.6. Minerales	15
2.1.5.7. Vitaminas	15
2.1.5.8. Lípidos.....	16
2.1.5.9. Compuestos aromáticos.....	16
2.1.5.10. Compuestos fenólicos	16
2.1.5.11. Humedad	17
2.1.5.12. Actividad del agua (aw)	17
2.1.5.13. pH.....	17
2.1.5.14. Hidroximetilfurfural (HMF)	17
2.1.5.15. Enzimas de la miel.....	18
2.2. Color.....	19
2.2.1. Sistema CIE Lab	20
2.3. Meliponicultura.....	20
2.4. Abejas	21
2.4.1. <i>Scaptotrigona mexicana</i>	23
2.5. Actividades biológicas de la miel	24
2.5.1. Actividad antioxidante	25
2.5.1.2. Flavonoides	26

2.5.2. Actividad antidiabética	26
2.5.3. Actividad gastroprotectora	27
2.6. Microbiota intestinal.....	29
2.6.1. Probióticos.....	31
2.6.2. Bacterias ácido lácticas.....	32
2.6.3. <i>Lactobacillus</i>	33
2.6.4. <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	35
2.7. Fermentación	35
3. OBJETIVOS	38
3.2. Objetivo general.....	38
3.3. Objetivos específicos.....	38
4. HIPÓTESIS	38
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	39
5.2. Primer etapa: Revisión sistemática y metaanálisis.....	39
5.3. Segunda a etapa: Caracterización fisicoquímica.....	39
5.4. Tercera etapa: Fermentación controlada y bioactividad.....	39
6. MATERIALES Y MÉTODOS	40
6.2. Primera etapa	40
6.2.1. Revisión sistemática y metaanálisis	40
6.2.1.1. Estrategia de búsqueda.....	40
6.3. Segunda Etapa	43
6.3.1. Obtención de la muestra.....	43
6.3.2. Análisis fisicoquímicos	44
6.3.2.1. Humedad	44
6.3.2.2. Cenizas	44
6.3.2.3. Actividad de diastasa.....	45
6.3.2.4. Hidroximetilfurfural (HMF)	45
6.3.2.5. Azúcares reductores.....	46
6.3.2.6. Acidez libre y pH.....	46
6.3.2.7. ° Brix	46
6.3.2.8. Actividad de agua	47
6.4. Compuestos bioactivos	47
6.4.1. Obtención de extractos	47
6.4.2. Contenido total de fenoles	47
6.4.3. Contenido total de flavonoides.....	47

6.5.	Determinación del contenido de antioxidantes	48
6.5.1.	Ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)	48
6.5.2.	Ensayo ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina 6-sulfónico)	48
6.6.	Ánalisis de resonancia magnética nuclear (RMN ¹ H).....	48
6.7.	Tercer etapa	50
6.7.1.	Cepa bacteriana	50
6.7.2.	Preparación del medio MRS para la fermentación.....	50
6.7.3.	Fermentación.....	50
6.7.4.	Ensayo <i>in vitro</i> de inhibición de la α -amilasa.....	51
6.7.5.	Cinética de la inhibición de la α -amilasa.....	51
6.7.6.	Ensayo <i>in vitro</i> de inhibición de la ureasa	52
6.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53
6.8.1.	Primer etapa: Revisión sistemática y metaanálisis	53
6.8.2.	Segunda etapa: Caracterización Fisicoquímica	53
6.8.3.	Procesamiento de espectros de RMN ¹ H	54
6.8.4.	Tercer etapa: Fermentación.....	54
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
7.2.	Primer etapa: Revisión sistemática y metaanálisis	56
7.2.1.	Compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante	56
7.2.2.	Composición fisicoquímica	65
7.2.3.	Análisis de metarregresión.....	65
7.2.4.	Humedad	68
7.2.5.	Acidez libre	69
7.2.6.	Hidroximetilfurfural (HMF)	69
7.2.7.	Color	70
7.3.	Segunda etapa: caracterización fisicoquímica	71
7.3.1.	Humedad	71
7.3.2.	Cenizas	72
7.3.3.	Actividad de la diastasa	73
7.3.4.	Hidroximetilfurfural	74
7.3.5.	Azúcares reductores	74
7.3.6.	Acidez libre, lactona y acidez total	75
7.3.7.	°Brix	76
7.3.8.	Actividad del agua (Aw)	77
7.3.9.	pH	78

7.3.10. Proteínas	78
7.3.11. Color	79
7.3.12. Fenoles Totales	81
7.3.13. Flavonoides	83
7.3.14. Actividad Antioxidante (DPPH y ABTS)	83
10.6.14.1 . Matriz de dispersión y correlación de Spearman	85
7.3.14.1. Análisis jerárquico de conglomerados	87
7.4. Análisis quimiométricos (rmn ^1h)	90
7.5. Tercer etapa	92
7.5.1. Fermentación	92
7.6. Cambios fisicoquímicos post fermentación	99
7.6.1. Parámetros fisicoquímicos	99
7.6.2. Fenoles totales y Flavonoides	101
7.6.3. Actividad antioxidante	106
7.7. Actividades biológicas	108
7.7.1. Ensayo <i>in vitro</i> de inhibición de α -amilasa	108
7.7.2. Cinética de inhibición de la α -amilasa	110
7.7.3. Inhibición de la ureasa	112
7.7.4. Cinética de inhibición de la ureasa	114
8. CONCLUSIÓN	119
9. RERENCIAS	121
ANEXOS	140

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cajón mortorio, nido y potes con miel de <i>S. mexicana</i> . Autoría propia.....	23
Figura 2. Estructura general de un flavonoide.....	26
Figura 3. Diagrama de flujo del estudio de elementos de informe preferidos para revisiones sistemáticas y metanálisis (PRISMA) de la revisión sistemática	40
Figura 4. Mapa que indica el sitio en el que fueron recolectadas las muestras de miel de <i>Scaptotrigona mexicana</i> . Map data © 2025 Google.	44
Figura 5. Diagrama de bosque del contenido de flavonoides (mg QE/100 g) para ensayos con fuentes florales, divididos en orígenes monoflORALES y multiflORALES.....	58
Figura 6. Diagrama de bosque del contenido de flavonoides (mg QE/100 g) para ensayos que incluyeron diferentes géneros de abejas sin aguijón..	59
Figura 7. Actividad antioxidante del diagrama de bosque con FRAP ($\mu\text{mol Fe (II)}/100 \text{ g}$) para ensayos que incluyeron diferentes géneros de abejas sin aguijón.....	62
Figura 8. Diagrama de bosque de la actividad antioxidante con ensayos de origen floral FRAP ($\mu\text{mol Fe (II)}/100 \text{ g}$), divididos en origen monofloral y polifloral..	63
Figura 9. Gráfico de cajas que explican de la variación en el contenido de compuestos fenólicos (A) y flavonoides (B)	82
Figura 10. Gráficos de cajas que explican el ensayo ABTS y DPPH expresado en mg Equivalentes de Ácido Gálico.....	85
Figura 11. Matriz de diagramas de dispersión ilustra las relaciones por pares entre el color, los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante (ensayos ABTS y DPPH) de la miel de <i>Scaptotrigona mexicana</i>	87
Figura 12. Análisis de conglomerados (clustering jerárquico) de muestras de miel de diferentes localidades de la especie <i>Scaptotrigona mexicana</i>	89
Figura 13. Diagrama de análisis de conglomerados que muestra la agrupación de diferentes muestras de miel de <i>Scaptotrigona mexicana</i>	89
Figura 14. Gráfica de puntuación PLS-DA derivadas de espectros de RMN 1H a 700 MHz de extractos de miel clorofórmica.	90
Figura 15. OPLS-DA en muestras de miel de abejas sin aguijón (<i>S. mexicana</i>) y con aguijón (<i>Apis mellifera</i>).....	91
Figura 16. Cinética de crecimiento monitoreada por densidad óptica para <i>Lactobacillus rhamnosus</i> usando distintas concentraciones de miel de <i>S. mexicana</i> como fuente de carbono durante 48 horas a 37°C.	93
Figura 17. Modelo de Monod para <i>Lactobacillus rhamnosus</i> utilizando como sustrato miel de <i>S. mexicana</i> en distintas concentraciones sustrato (g/L).....	93
Figura 18. Modelo de Haldane para <i>Lactobacillus rhamnosus</i> utilizando como sustrato miel de <i>S. mexicana</i> en distintas concentraciones sustrato (g/L). μ =tasa de crecimiento específica.	94

Figura 19. Curvas de crecimiento adaptado al Modelo de Gompertz modificado para <i>Lactobacillus rhamnosus</i> utilizando como sustrato miel de <i>S. mexicana</i>	95
Figura 20. Curvas de crecimiento adaptado al Modelo de regresión cuadrática. μ_{max} =Tasa máxima de crecimiento vs concentración de miel en %.	96
Figura 21. Cinética de crecimiento monitoreada por densidad óptica para <i>Lactobacillus rhamnosus</i> utilizando3 muestras de miel de <i>S. mexicana</i> (2, 7 y 18) como fuente de carbono durante 48 horas a 37°C.	97
Figura 22. Cambios cinéticos en el contenido azúcares reductores durante la fermentación de las muestras (2, 7 y 18) evaluados de 0 a 48 h.	99
Figura 23. Cambios cinéticos en el pH durante la fermentación de las muestras (2, 7 y 18) evaluados de 0 a 48 h.....	100
Figura 24. Cambios cinéticos de acidez libre durante la fermentación de las muestras (2, 7 y 18) evaluados de 0 a 48 h..	101
Figura 25. Cambios cinéticos en el contenido de Fenoles Totales expresado en mg equivalentes de ácido gálico durante la fermentación de las muestras (2, 7 y 18) evaluados de 0 a 48 h.	102
Figura 26. Cambios cinéticos en el contenido flavonoides totales expresados en mg equivalentes de quer cetina durante la fermentación de las muestras (2, 7 y 18) evaluados de 0 a 48 h..	104
Figura 27. Cambios cinéticos en la actividad antioxidante por el método de ABTS expresados en mg equivalentes de ácido gálico durante la fermentación de las muestras (2, 7 y 18) evaluados de 0 a 48 h.....	106
Figura 28. Cambios cinéticos en la actividad antioxidante por el método de DPPH expresados en mg equivalentes de ácido gálico durante la fermentación de las muestras (2, 7 y 18) evaluados de 0 a 48 h.	108
Figura 29. Efectos de concentraciones graduadas de extractos de acuosos de miel de abeja sin aguijón de Cruz Blanca sobre la inhibición de la α -amilasa <i>in vitro</i>	110
Figura 30. Cinética de inhibición de la α -amilasa....	112
Figura 31. Efectos de concentraciones graduadas de extractos de acuosos de miel de abeja sin aguijón de 3 regiones distintas sobre la inhibición de la ureasa <i>in vitro</i>	112
Figura 32. Cinética de inhibición de la ureasa Cinética de inhibición de la ureasa.....	116
Figura 33. Análisis multivariado (PCA) de los parámetros bioactivos después de 48 horas de fermentación controlada.....	117

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los sitios de muestreo, incluyendo ubicación, número de muestras de miel, latitud-longitud, altitud (msnm), temperatura (°C), clima y precipitación media anual (mm).....	43
Tabla 2. Diferencia de medias estandarizada (SMD) y diferencia de medias bruta (RMD) del modelo de efectos aleatorios con IC del 95% y una prueba de heterogeneidad de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y resultados de parámetros fisicoquímicos de la miel de <i>Apis mellifera</i> y abeja sin aguijón.....	56
Tabla 3. Pendientes de metarregresión y significancia de covariables para resultados con una heterogeneidad moderada o alta ($P > 25\%$).....	66
Tabla 4. Comparación media de los parámetros fisicoquímicos de las muestras de <i>Scaptotrigona mexicana</i> recolectadas en diferentes localidades del estado de Puebla, México, en comparación con los estándares de miel de <i>Apis mellifera</i> , incluyendo cenizas, actividad diastásica, hidroximetilfurfural (HMF), azúcares reductores y acidez libre (n=24).....	72
Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos de muestras de <i>Scaptotrigona mexicana</i> en la selva cálida húmeda de Puebla, México.	76
Tabla 6. Color de muestras de miel de <i>Scaptotrigona mexicana</i> en la selva cálida húmeda de Puebla, México.....	80
Tabla 7. Parámetros de crecimiento bacteriano para el modelo de Monod.	93
Tabla 8. Parámetros de crecimiento bacteriano para el modelo de Haldane.....	94
Tabla 9. Parámetros de crecimiento bacteriano para el modelo de Gompertz modificadode la muestra de La Palmilla de <i>Scaptotrigona mexicana</i>	95
<i>Tabla 10.</i> Cinéticas de inhibición de la enzima α -amilasa con extractos de miel de <i>Scaptotrigona mexicana</i> 112	
<i>Tabla 11.</i> Cinéticas de inhibición de la enzima ureasa con extractos de miel de <i>Scaptotrigona mexicana</i> 116	

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la salud pública se ha enfocado en la prevención de enfermedades crónicas degenerativas desde un enfoque positivo, lo que implica dejar de prohibir alimentos e incluir con mayor frecuencia aquellos con efectos activos y positivos sobre la salud. La creciente percepción de los consumidores sobre la relación entre el consumo de alimentos saludables y la prevención de enfermedades ha provocado un aumento en la demanda de alimentos más nutritivos que aporten un beneficio a la salud. Un alimento funcional es aquel que, ha demostrado que posee un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas en el organismo, además de su valor nutritivo, pueden reducir el riesgo de contraer ciertas enfermedades. Los alimentos funcionales pueden mejorar algunas funciones fisiológicas por mencionar un ejemplo, se encuentran los alimentos fermentados con la adición de probióticos. Actualmente existe una gran variedad de alimentos funcionales, uno de ellos es la miel de abejas sin aguijón sin embargo de acuerdo a su composición química predominan los carbohidratos, específicamente la fructosa y glucosa, dichos nutrientes en exceso pueden contrarrestar los efectos positivos de la miel, diversos estudios han documentado que los alimentos con alto contenido de azúcares puede favorecer el desarrollo de obesidad, caries, enfermedades cardiovasculares, procesos inflamatorios, estrés oxidativo, deterioro cognitivo y otras patologías (Hernández, 2010; Díez, 2020; Gómez et al., 2013; Montaño, 2017).

Actualmente en México se produce miel a partir de las abejas de la especie *Apis mellifera* (*A. mellifera*) (abeja europea) y de abejas sin aguijón (Ranneh et al., 2021). En México se han identificado 46 especies de abejas sin aguijón, una de las cuales es *Scaptotrigona mexicana* (*S. mexicana*), la cual fue utilizada por sociedades precolombinas mexicanas para producir miel y cerumen. La producción y cuidado de *S. mexicana* aún se practica en los estados de Veracruz, San Luis Potosí, Hidalgo, Yucatán y Puebla. La miel de *S. mexicana* es ampliamente valorada debido a su importancia en las economías locales, relevancia cultural, importancia ecológica y atributos terapéuticos (Xolalpa-Aroche et al., 2024). Este alimento es considerado un alimento funcional debido a su composición química ya que contiene carbohidratos, vitaminas, minerales, proteínas, enzimas, ácidos orgánicos, aminoácidos y compuestos fenólicos (Jiménez et al., 2016). De acuerdo con

estudios previos acerca de la composición fisicoquímica de la miel de *S. mexicana*, esta se caracteriza por tener alto contenido de humedad, lo que la convierte en un medio susceptible a desarrollar procesos de fermentación por la presencia o adición de microorganismos.

Jimenez y colaboradores (2016) realizaron un estudio acerca de la composición fisicoquímica y capacidad antioxidante de miel de *S. mexicana* ya que este tipo de miel difiere en sus parámetros fisicoquímicos comparada con la miel de *Apis mellifera*. Se han realizado diversos estudios e investigaciones en las que se informa de diversas funciones biológicas de la miel de abejas sin aguijón como el efecto antihipertensivo, antiinflamatorio, antifúngico, antibacteriano, hipoglucemiante y antioxidante (Cruz, et al., 2014; García-Chiaviano et al., 2022). Das y colaboradores (2015) determinaron el efecto de la miel de sésamo de abejas sin aguijón, en el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) y *B. bifidum*. Los resultados mostraron que 24 horas después de la incubación, las bacterias *L. acidophilus* y *B. bifidum* alcanzaron poblaciones más altas cuando crecieron en caldo MRS sin carbohidratos suplementado con miel de sésamo que en caldo MRS sin suplementar. En este contexto, la miel de *S. mexicana* representa un sustrato apto para la fermentación, debido a su composición con un alto contenido de humedad (>20%), alta actividad de agua (>0.8), monosacáridos, aminoácidos, vitaminas, minerales, entre otros, que pueden favorecer el crecimiento de microorganismos benéficos como *Lactobacillus rhamnosus*.

La falta de regulación específica y la escasez de investigaciones sobre las propiedades fisicoquímicas de miel de abejas sin aguijón han dificultado su posicionamiento en el mercado global, limitando su producción y distribución debido a que no cumple los requisitos de control de calidad de los estándares internacionales, lo que restringe su comercialización y afecta a los meliponicultores. Por lo tanto, es fundamental realizar estudios que permitan caracterizar sus propiedades y establecer parámetros que faciliten su reconocimiento como un producto diferenciado con alto valor agregado. El incremento en la prevalencia de enfermedades crónico-degenerativas a nivel mundial ha generado un interés creciente en el desarrollo de alimentos funcionales. En este contexto, surge la necesidad de explorar alternativas alimenticias que, además de aportar energía, ofrezcan beneficios adicionales para la salud. En los últimos años, la industria alimentaria ha

desarrollado estrategias innovadoras para mejorar la calidad y funcionalidad de los alimentos, destacando la fermentación con probióticos como una de las más efectivas. El objetivo de este estudio fue analizar las propiedades físicoquímicas de la miel de *S. mexicana*, así como el efecto de la adición de *Lactobacillus rhamnosus* en términos de su viabilidad durante la fermentación, cambios en la composición química y la generación de compuestos bioactivos.

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

en 2021 se reportaron 35.4 millones de personas que desarrollan enfermedades crónico-degenerativas a nivel mundial, (OMS, 2025) y cada año continúan incrementando. Diversos estudios han señalado la necesidad de analizar los factores que contribuyen a este fenómeno, identificando la alimentación como factor crucial entre los que destaca el consumo excesivo de azúcar como un elemento clave en el deterioro de la salud de la población (Cruz et al., 2014). Se ha demostrado que alimentos con alto contenido de azúcares pueden favorecer el desarrollo de obesidad, caries, enfermedades cardiovasculares, procesos inflamatorios, estrés oxidativo, deterioro cognitivo y otras patologías (Hernández, 2010; Díez, 2020; Gómez et al., 2013; Montaño, 2017). La miel, aunque es un producto natural con propiedades beneficiosas, tiene un alto contenido de monosacáridos específicamente de fructosa y glucosa, cuyo consumo excesivo puede generar problemas de salud, como sobrepeso, diabetes, hipertrigliceridemia. Sin embargo dentro de los endulzantes disponibles es el único que proporciona vitaminas, minerales y compuestos bioactivos. Dentro de las mieles que se producen actualmente, la miel de *Scaptotrigona mexicana* se caracteriza por un contenido menor de azúcares en comparación la miel de *A. mellifera*. Sin embargo la miel de *S. mexicana* enfrenta barreras en su comercialización, ya que la normativa actual está diseñada para la miel de *A. mellifera*, lo que limita su reconocimiento y aceptación en el mercado. Por lo anterior el análisis de la composición fisicoquímica es importante para establecer parámetros microbiológicos y de calidad específicos para el desarrollo de una normativa específica para este tipo de miel. En este contexto, los meliponicultores han reducido su producción, afectando la preservación de una práctica de relevancia ecológica y cultural que data de las civilizaciones maya, totonaca y nahua, quienes se consideran pioneros en el cuidado y manejo de abejas sin aguijón para la producción de miel (Pat et al., 2018; Zepeda, 2022). La miel de *S. mexicana* presenta menor contenido de azúcar, mayor humedad, alta actividad de agua y un elevado contenido de compuestos bioactivos como fenoles y flavonoides lo que podría influir en sus propiedades nutricionales y funcionales. En este sentido, la miel de *S. mexicana* podría ser un medio apto para la incorporación de microorganismos probióticos como *Lactobacillus rhamnosus* en un proceso de fermentación controlada. Esto podría potenciar las propiedades funcionales de la miel de

S. mexicana, transformándola en un alimento simbiótico con beneficios adicionales para la salud. La sinergia entre los compuestos prebióticos de la miel y la actividad probiótica de la bacteria podría ofrecer una alternativa más saludable en comparación con otros edulcorantes naturales.

1.3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente ha incrementado la demanda y el interés en el desarrollo de alimentos funcionales, por lo que surge la necesidad de explorar alternativas alimenticias ofrezcan beneficios adicionales para la salud. La miel es un producto natural en el que predominan los carbohidratos, lo que podría representar un riesgo si se consume en exceso, ya que dependiendo de la cantidad puede incrementar los niveles de glucosa en sangre. Sin embargo, la miel de *S. mexicana* posee características fisicoquímicas únicas como menor contenido de azúcar, mayor humedad, alta actividad de agua y un mayor contenido de ácidos libres. A pesar de estos atributos, existe una falta de estudios detallados sobre sus propiedades fisicoquímicas y biológicas lo que ha limitado su inclusión en los estándares internacionales de calidad, limitando su comercialización y afectando a los meliponicultores. Por lo tanto, es fundamental realizar estudios relacionados a su composición fisicoquímica que permitan establecer parámetros para crear una normativa de control de calidad específica para la miel de abejas sin aguijón lo que favorece a productores y comercialización a nivel global. En los últimos años, la industria alimentaria ha desarrollado estrategias innovadoras para mejorar la calidad y funcionalidad de los alimentos, destacando la fermentación con probióticos como una de las más efectivas. En sentido, la miel de *S. mexicana* representa un sustrato apto para el crecimiento de microorganismos benéficos como *L. rhamnosus*. La adición de *L. rhamnosus* en un proceso de fermentación controlada podría generar cambios bioquímicos favorables en la miel, incluyendo la reducción de su contenido de azúcar y el incremento en la concentración de compuestos bioactivos como fenoles, flavonoides y ácidos orgánicos. Estos cambios no solo mejorarían su perfil nutricional, sino que también podrían potenciar su capacidad antioxidante y otros efectos biológicos beneficiosos. Este estudio contribuirá al conocimiento sobre la miel de *S. mexicana*, a su revalorización cultural, respaldo científico de sus actividades biológicas y la promoción de su aprovechamiento

en la producción de alimentos innovadores con valor agregado. Además, la generación de información científica sobre este producto servirá como base para futuras regulaciones que permitan su reconocimiento en normativas nacionales e internacionales, favoreciendo así su comercialización y el fortalecimiento del sector meliponicultor. Por lo tanto, la fermentación de la miel de *S. mexicana* con *L. rhamnosus* representa una estrategia innovadora con un alto potencial para mejorar sus propiedades funcionales y nutricionales, además de constituir una alternativa viable para el desarrollo de productos con beneficios para la salud. La implementación de este proceso no solo beneficiará a los consumidores, sino que también abrirá nuevas oportunidades en el mercado de alimentos funcionales y contribuirá al reconocimiento de la miel de abejas sin aguijón como un producto con características únicas y diferenciadas.

1.4. ANTECEDENTES

Existen aproximadamente 600 especies de abejas sin agujón en la zona tropical y subtropical del mundo (Vit et al., 2004). Debido a la diversidad de especies de abejas sin aguijón, la miel que producen tiene características propias de cada especie de abeja (Cruz, et al., 2014). Se ha identificado que la miel de abejas sin aguijón posee una gran cantidad de compuestos bioactivos con una amplia gama de efectos biológicos positivos (Ruiz-Ruiz et al., 2017). De acuerdo a Rodríguez-Malaver et al. (2012) la miel de abeja sin aguijón presenta menor cantidad de diastasa, variaciones en el contenido de azúcar, mayor contenido de agua y acidez con respecto a los estándares de la miel de la especie *A. mellifera* (Moreira et al., 2023). Debido al mayor contenido de agua y de acidez, se ha reportado la posibilidad de desarrollar procesos de fermentación en la miel de *S. mexicana* (Pérez- Pérez et al., 2007).

En los últimos años, se ha sugerido una variedad de alimentos, incluidas las mieles, como fuente potencial de componentes prebióticos principalmente por su contenido fructooligosacáridos. Das y colaboradores (2015) determinaron el efecto de la miel de sésamo sobre *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) y *B. bifidum*. Los resultados mostraron que 24 horas después de la incubación, las bacterias *L. acidophilus* y *B. bifidum* alcanzaron poblaciones más altas cuando crecieron en caldo MRS sin carbohidratos suplementado con miel de sésamo que en caldo MRS sin suplementar. Las muestras que contenían la miel de sésamo mostraron una tasa de crecimiento significativamente mayor ($p \leq 0,05$) en comparación con el control, la evaluación del crecimiento se realizó mediante espectrofotometría a 600 nm. De Melo y colaboradores (2020) realizaron un estudio en el que utilizaron miel de dos especies de abejas sin aguijón, *Melipona subnitida* Ducke y *Melipona scutellaris* Latrelle con una concentración de 20g/L y 30 g/L de miel en un medio de cultivo sin fuente de carbono. Agregaron dos cepas de probióticos *L. acidophilus* La-05 y *B. lactis* BB-12. Los resultados en este estudio mostraron un crecimiento limitado en caldo sin fuente de carbono (sin miel). Las curvas de crecimiento obtenidas para *L. acidophilus* LA-05 o *B. lactis* BB-12 en caldo con 20 y 30 g/L de miel no difirieron ($p < 0.05$) en general de las obtenidas en caldo con glucosa o FOS. También se reportó disminución de pH, glucosa y fructosa. Se identificaron un total de nueve compuestos fenólicos, tres ácidos fenólicos y seis flavonoides, en el caldo con

miel durante las 48 h de cultivo, previamente a la fermentación no se detectaron esos compuestos, lo que indica que después del proceso de fermentación incrementa el contenido de compuestos fenólicos y la producción de distintos por el metabolismo bacteriano. Razali et al. (2019) realizaron un estudio en el que evaluaron las propiedades prebióticas de la miel de abeja sin aguijón, con la adición de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus brevis*. Como resultados reportaron que mejoró el contenido fenólico total en un 47,2%. Jan et al., (2010) investigaron los efectos de la miel en el crecimiento de *Bifidobacterium longum* BB 536 (*B. longum*). Los resultados demostraron que las muestras de miel silvestre favorecían el crecimiento de *B. longum*. En este estudio el crecimiento se atribuyó a los fructooligosacáridos identificados que fueron inulobiosa, kestosa y nistosa.

Se ha reportado que debido a la diversidad de carbohidratos presentes en la miel como los no digeribles en forma de oligosacáridos, algunos tipos de miel tienen actividad prebiótica, esto se ha comprobado de manera *in vitro*, en animales y piloto en humanos. La actividad prebiótica podría colocar a la miel como una opción de tratamiento adecuada para beneficiar la microbiota y reducir las enfermedades intestinales. (Schell et al., 2022). Algunos estudios *in vivo* con modelos animales muestran que la miel es capaz de promover las poblaciones de bacterias probióticas, incluyendo *Bifidobacterium spp.* y *Lactobacillus spp.* Shamala et al. (2000) evaluaron el efecto de la miel y la sacarosa sobre las bacterias del ácido láctico *in vitro* y en el intestino de ratas para determinar si estos organismos se vieron afectados de manera diferente por la miel en comparación con la sacarosa. En condiciones *in vitro*, el número de conteos de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum* aumentó de 10 a 100 veces en presencia de miel en comparación con la sacarosa. La alimentación con miel a ratas también resultó en un aumento significativo en los conteos de bacterias del ácido láctico. Por su parte Hasyimi et al. (2020) realizaron un estudio en él se evaluó la incorporación de miel como agente prebiótico, los resultados mostraron un aumento en la diversidad de *Microbacterium*, *Lactobacillus* y *Neptunomonas*. El-Arab et al. (2006) en su investigación concluyeron que los azúcares presentes en la miel mejoran la microbiota intestinal. Li et al. (2020) evaluaron la incorporación de miel en la dieta de ratas, como resultado, la miel mostró modular la composición microbiana de la microbiota, evaluado mediante secuenciación genómica de ARNr 16S.

2. MARCO TEÓRICO

2.2. Miel

2.1.1. Antecedentes históricos

El uso de la miel se remonta a tiempos prehistóricos, de acuerdo a representaciones de arte rupestre del Paleolítico halladas en las cuevas de Bicorp y dos agua (Valencia) y en el barranco de La Valltorta, Tirrig (Castellón) en donde se muestra a individuos colgando de una soga para llegar a un agujero de la roca en dónde hay una colmena. La primera referencia aparece en una tabla de Sumeria que data del año 2100 -2000 a.C. en la que la miel se usa como medicamento y cómo ungüento. Nuestros antepasados consumían miel recolectándola de colmenas, ahumeaban las colmenas para ahuyentar a las abejas y extraer la miel. La apicultura data del Neolítico, en los comienzos de la agricultura. La civilización egipcia destaca el uso de la miel como alimento, medicamento y bebida (hidromiel). Los romanos la consideraban fuente importante de fortaleza. Los hispanoárabes utilizaban la miel en la pastelería, los musulmanes en la medicina. Los principales países exportadores de miel son China, Argentina y México. La introducción del azúcar de caña y azúcar de remolacha ocasionó una disminución en el consumo de miel. La miel fue durante muchos años el principal alimento concentrado en azúcares consumido por el hombre; sin embargo, al inicio de la época industrial en Europa (finales del siglo XVIII) comenzaron a cambiar los hábitos de consumo utilizando azúcar como edulcorante de mesa.

2.1.2. Definición.

La miel es una sustancia natural dulce (Erejuwa et al., 2012) producida por las abejas; actualmente, se producen dos tipos de miel a nivel mundial: la miel tradicional de *A. mellifera* y la miel de abejas sin aguijón (Ranneh et al., 2021). Las abejas producen la miel a partir del néctar de las flores, de las secreciones de las plantas o de las excreciones de algunos insectos succionadores (miel de mielada), las abejas recolectan alguno de los anteriores y lo transforman al combinarse con sustancias propias, posteriormente lo depositan, deshidratan, almacenan y se conserva en las colmenas para que maduren (Jay, 2002). El color de la miel puede de ir de incoloro a pardo oscuro; su consistencia puede ser fluida o viscosa en cuanto al sabor y aroma estos varían de acuerdo a la planta

de origen (Cruz, et al., 2014). La miel se considera un alimento funcional ya que diversos estudios demuestran los beneficios de la miel en la salud (Erejuwa et al., 2012; Vit et al., 2013; Ranneh et al., 2021).

2.1.3. Elaboración

Las abejas introducen bien el néctar o mielato en su buche e incorporan secreciones salivares, ricas en enzimas (diastasas, invertasa y glucosa oxidasa). Durante el transporte inicia la transformación de néctar o mielada en miel por la acción enzimática, principalmente por la invertasa o sacarasa. El contenido de buche es almacenado en los panales, donde se produce la concentración del producto hasta obtener un 82% de materia seca; en ese momento y con el objetivo de que la miel tenga contacto con el aire, del cual podría absorber agua por su capacidad higroscópica, las abejas recubren la célula llena de miel con un opérculo de cera pura. La transformación del néctar y el mielato en miel se debe a la inversión de la sacarosa en una mezcla de glucosa y fructosa bajo la acción de la sacarasa, incorporada por la abeja a través de su saliva. La invertasa continúa actuando sobre la sacarosa a lo largo de toda la vida de la miel, si no realiza ningún tratamiento térmico, entre más vieja sea la miel, menor contenido de sacarosa.

2.1.4. Tipos de miel

La miel se puede clasificar de acuerdo con su origen o elaboración.

Origen botánico

Según su origen botánico:

- Miel de flores o miel de néctar:
 - Miel unifloral o monofloral: se designa una miel como monofloral cuando el tipo de polen que la caracteriza está presente en su sedimento en cantidades superiores al 45% del total
 - Miel multifloral o polifloral o milflores: son mieles en las cuales no predomina ninguna forma polínica sobre las demás
- Miel de mielada: suele proceder de la encina y del roble.

De acuerdo a su elaboración:

- Miel en panal: producto que consiste en miel almacenada por las abejas en los alvéolos sellados de panales recién construidos o en delgadas láminas de cera en forma de panal
- Miel en trozos de panal o panales cortados: miel que incluye uno o varios fragmentos de panal de miel en su composición.
- Miel escurrida: miel obtenida al dejar escurrir el contenido de los panales previamente desoperculados, sin aplicar fuerza mecánica.
- Miel centrifugada: miel extraída mediante el proceso de centrifugación de los panales desoperculados para separar el líquido de la cera.
- Miel prensada: miel obtenida mediante la comprensión de los panales, para eliminar larvas, con o sin incremento de temperatura en el proceso
- Miel filtrada: producto que se obtiene mediante la eliminación de residuos orgánicos o inorgánicos que no pertenecen a la miel, pero sin eliminación del polen (Jay, 2002).

2.1.5. Composición química

La miel es un producto biológico muy complejo por lo que su composición química varía debido a diversos factores como la naturaleza del suelo, clima, zona geográfica, especies cosechadas (el tipo de planta influye en las propiedades de la miel), raza de la abeja y estado fisiológico de la colonia (Erejuwa et al., 2012). La miel está compuesta principalmente aproximadamente en un 80% por azúcares (principalmente glucosa y fructosa) y otros constituyentes (Cruz, et al., 2014) como agua en 17% y 3% de sustancias diversas como enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas, minerales, pigmentos, compuestos fenólicos, compuestos volátiles y partículas sólidas derivadas de la cosecha de miel (Seraglio et al., 2021). En cuanto a los compuestos fenólicos se ha demostrado que tiene una gran cantidad de flavonoides y ácidos fenólicos, los cuales exhiben una amplia gama de efectos biológicos demostrados en estudios previos (Manzanares et al., 2014; Da Silva et al., 2015).

2.1.5.1. Hidratos de carbono

La miel es un alimento naturalmente dulce debido a que está compuesto principalmente por hidratos de carbono (Seraglio et al., 2021) que son moléculas orgánicas presentes

en diversos alimentos como la miel, componen del 60 a 95% en peso seco (Ranneh et al., 2021). Se pueden identificar monosacáridos (70%), disacáridos (9%), trisacáridos y otros oligosacáridos (1.5%) donde el tipo floral es un factor clave en la modulación de esta proporción (Jay, 2002; Da Silva et al., 2015). Los monosacáridos suelen estar presentes en un porcentaje promedio de 38% para la fructosa y la glucosa con un 31% aunque pueden existir excepciones. Estos provienen de la degradación de sacarosa bajo la acción de la invertasa. Con el envejecimiento de la miel disminuyen los monosacáridos y aumentan los oligosacáridos; con el paso del tiempo la fructosa se degrada hasta convertirse en hidroximetilfurfural o bien puede formar oligosacáridos.

Los disacáridos disponibles son varios, el más abundante es la maltosa (7%), la sacarosa (1-3%) y en menor proporción la trehalosa (<2.5%), isomaltosa (0.5-1.5%), turanosa (0.5-1.5%), nigerosa (0.2-1%), melibosa (<0.5%), palatinosa (<0.3%) kojibiosa, gentibiosa, maltulosa y laminaribiosa, entre otros (Ranneh et al., 2021).

Trisacáridos y otros oligosacáridos: se encuentran principalmente: melecitosa (<5%), erlosa (<3.5%), rafinosa (<1%), 1-cestosa, teanderosa, maltotriosa, panosa, isopanosa, 6-glucosilsacarosa, 3-isomaltosilglucosa, isomaltotriosa, isomaltotetralosa, isomaltopentosa y arabinogalactomanano (Jay, 2002; Da Silva et al., 2015).

Para asegurar la autenticidad de la miel esta debe tener un contenido de fructosa y glucosa igual o mayor al 60%. El contenido de sacarosa no debe ser mayor del 5% (Da Silva et al., 2015). La miel también contiene entre un 4 y un 5 % de fructooligosacáridos (FOS), que sirven como agentes prebióticos (Oršolić et al., 2017).

2.1.5.2. Azúcares reductores

En la miel se pueden encontrar azúcares reductores que son biomoléculas que contiene un grupo carbonilo (C=O) en su estructura, que tienen la función de reducir sustancias; es decir, que su mecanismo consiste en donar electrones al reaccionar con otra molécula (Ranneh et al., 2021). Para la identificación de azúcares reductores se puede utilizar el método volumétrico de Lane-Eynon, el cual se fundamenta en medir el volumen de una disolución de la muestra necesario para reducir por completo un volumen determinado de un reactivo alcalino de cobre. Previo al análisis, la muestra debe someterse a una preparación previa en la que los azúcares no reductores, como los disacáridos y polisacáridos, son hidrolizados. Este proceso implica la ruptura de los enlaces glucosídicos generando monosacáridos, principalmente glucosa y fructosa, los cuales

poseen grupos funcionales libre como un grupo carboxílico y un grupo cetona. En medio alcalino y bajo altas temperatura, estos azúcares reductores se oxidan al reaccionar con la solución de Fehling (mezcla de sulfato cúprico y tartrato doble de sodio y potasio). Durante la reacción, los iones cúpricos se reducen a óxido cuproso, lo que produce una sal de sodio y la formación de un precipitado color rojo ladrillo.

2.1.5.3. Agua

El agua es el segundo componente mayoritario de la miel y su contenido está relacionado con el origen botánico y clima, así como el grado de madurez (momento de la extracción). Los valores habituales van del 17-18% sin embargo pueden variar entre 14-25% (Seraglio et al., 2021). La miel tiene una gran tendencia a captar agua, cuando la humedad relativa ambiental es igual o superior al 60%. Sin embargo, un elevado contenido de agua puede originar una fermentación y favorecer al desarrollo de un pardeamiento químico (Jay, 2002).

2.1.5.4. Compuestos nitrogenados

El contenido de nitrógeno en la miel oscila entre 0.03 y 0.13%. Los principales constituyentes son aminoácidos libres y enzimas siendo la principal fuente el polen (Ranneh et al., 2021). Las proteínas provienen de los insectos y de las plantas con un 0.2%. Por su parte las enzimas son aportadas por los insectos como la invertasa, diastasa (amilasa) y glucosa oxidasa; así como por las plantas como la fosfatasa alcalina y catalasa (Ramón-Sierra et al., 2015). La invertasa participa en la degradación de la sacarosa en glucosa, sin embargo en la etapa final de la maduración de la miel queda una pequeña cantidad de sacarosa presente (Ball, 2007). La diastasa se caracteriza por romper los enlaces químicos de la maltosa; se utiliza como indicador de calidad de la miel, donde la calidad de la miel es positivamente proporcional a la cantidad de diastasa (Yaghoobi et al., 2008). La glucosa oxidasa proviene de las glándulas faríngeas de la abeja y, por lo que, su cantidad es variada. El peróxido de hidrógeno que se produce tras la acción de la glucosa oxidasa sobre la glucosa contribuye a la acción antibacteriana de la miel. La presencia de estas enzimas en la miel es lo que la diferencia con respecto a otros edulcorantes (Ball, 2007). El contenido de aminoácidos libres es de 0.01% uno de los identificados es la prolina que puede tener una presencia del 30-80% (Ranneh et al.,

2021) 0.3-25 mg /kg de colina, 0.06- 5 mg/kg de acetilcolina y en menor cantidad están la asparagina, fenilalanina, ácido aspártico, glicina y serina (Yaghoobi et al., 2008).

2.1.5.5. Ácidos orgánicos

Se han encontrado aproximadamente 20 ácidos orgánicos que representa el 0.6% destacando el ácido acético, cítrico, láctico, mágico, oxálico, succínico, fórmico y butírico, siendo el mayoritario el ácido glucónico (Ranneh et al., 2021). Todos los ácidos contribuyen a pH de la miel que es de 3.3-4.6 para mieles florales y 5.5 para mieles de mielada. Los ácidos junto con los hidratos de carbono y el peróxido de hidrógeno contribuyen a la estabilidad microbiológica de la miel, así como también tienen un impacto considerable en la conservación, estabilidad y sensorialidad (sabor y aroma) y propiedades fisicoquímicas (acidez y pH) de este producto (Seraglio et al., 2021). Un valor elevado de los ácidos indica alteración por fermentación, por lo que el valor máximo es de 50mEq de ácidos/kg de miel (Jay, 2002).

2.1.5.6. Minerales

La cantidad de minerales presentes en la miel oscila de 0.05 a 1.5% en dicho porcentaje influye el origen botánico, clima, técnicas de extracción. El potasio es el elemento mayoritario, seguido del calcio, magnesio y sodio (Seraglio et al., 2021). En cantidades menores se encuentran el zinc, hierro, manganeso, cobre, cromo, selenio, aluminio, yodo, cloro y flúor (Da Silva et al., 2015) .

2.1.5.7. Vitaminas

Las vitaminas son un grupo de compuestos orgánicos que participan en el funcionamiento del metabolismo, crecimiento, desarrollo y regulan funciones celulares. Se requieren en cantidades pequeñas para formar coenzimas y cofactores (Zawawi et al., 2021). La vitamina predominante en la miel es la vitamina C (0.5-2.5mg/100g)(Jay, 2002). Algunos estudios indican que es la vitamina C presente en la miel tiene efectos antioxidantes, esto debido a que puede reducir la oxidación causada por el superóxido del ion de oxígeno. La miel también contiene vitaminas del complejo B como la tiamina (<0.01mg/100g), piridoxina (<0.03mg/100g), riboflavina (<0.02 mg/100g), niacina (<0.2 mg/100g), ácido pantoténico (<0.1 mg/100g) y ácido fólico (<0.01 mg/100g) (Jay, 2002; Zawawi et al., 2021).

2.1.5.8. Lípidos

Los ácidos grasos están presentes en la miel muy bajas cantidades como el ácido palmítico, oleico, láurico, esteárico, linoleico, etc. Provenientes de las micro partículas de cera que al ser tan pequeñas no pueden ser eliminadas (Jay, 2002).

2.1.5.9. Compuestos aromáticos

Se han identificado más de 500 compuestos responsables del aroma y el sabor de la miel (Escuredo et al., 2013) como los ésteres de ácidos alifáticos (formiato de metilo, acetato de metilo y etilo, laurato de etilo) y aromáticos (benzoato de metilo y etilo, fenilacetato de metilo y etilo). Aldehídos (formaldehído, acelatadehydo, 2-fenilacetaldéhido), cetonas (metilcetona y etilcetona) y alcoholes (metanol, etanol, 2-feniletanol). Su concentración media es de 0.020 -2 mg/kg (Seraglio et al., 2021).

2.1.5.10. Compuestos fenólicos

Se cree que la presencia de polifenoles en la miel proviene del néctar de la planta, mientras que la calidad y la cantidad de polifenoles dependen de la región geográfica, la fuente floral, las condiciones climáticas y el tipo de abeja (Ranneh et al., 2021).

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar en compuestos fenólicos simples (en su estructura solo tienen un fenol) y compuestos polifenólicos (contienen varios anillos en su estructura) (Jay, 2002). En la miel también se han identificado flavonoides, que son compuestos polifenólicos que tienen dos anillos fenólicos unidos por un puente de propano, su contenido es variable (20-2000 µg/100g de miel) provienen del néctar, polen y propóleo ya que se encuentran de manera natural en muchas partes de las plantas (Zawawi et al., 2021). Se han identificado el ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-cumárico, pinocembrina, queracetina, galangina, crisina, kaempferol, y pinobanksina (Manzanares et al., 2014). Son los responsables del color, junto con otros productos originarios de las reacciones de pardeamiento no enzimático. Se caracterizan por tener actividad antiséptica, antiinflamatoria y antioxidante (Zawawi et al., 2021). La miel de distintas regiones del mundo contiene tipos similares de ácidos fenólicos, incluidos el ácido gálico, ácido siríngico, ácido benzoico, ácido cinámico, (Erejuwa et al., 2012) cafeico, elágico, ferúlico y ácidos p-cumárico; y antioxidantes, como tocoferoles, ácido ascórbico, superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión reducido (GSH) (Rao et al.,

2016). Las principales actividades terapéuticas de la miel se atribuyen a su contenido de polifenoles porque son los fitoquímicos más abundantes (Ranneh et al., 2021).

2.1.5.11. Humedad

El contenido de agua de la miel está relacionado con factores como el clima, la humedad ambiental, la flora, zona geográfica y fuente de néctar así como las prácticas apícolas utilizadas para su obtención y comercialización (Seraglio et al., 2021). Las abejas eliminan el agua del néctar en el proceso de la maduración hasta un límite determinado por las propias abejas en el momento de opercular la miel. El contenido de agua puede determinar cambios en la viscosidad y la densidad, por haber sido extraída antes de su maduración o por la higroscopidad, una miel con 18% de agua se encuentra en equilibrio en una atmósfera donde la humedad relativa sea del 60% (Chuttong et al., 2016).

2.1.5.12. Actividad del agua (aw)

Es un factor significativo que se utiliza para determinar la prevención o restricción del crecimiento microbiano y, en muchos casos, es el parámetro clave responsable de la estabilidad de los alimentos, la modulación de la respuesta microbiana y la determinación del tipo de microorganismos que se encuentran en los alimentos (Ikhsan et al. 2022).

2.1.5.13. pH

El pH es de vital importancia en el control de calidad de mieles frescas y almacenadas por la influencia en el desarrollo y control de microorganismos y la evolución de enzimas; tiene un papel fundamental en la pérdida de aromas, generación de sabores indeseables, condiciones de textura, estabilidad y resistencia. El pH de disoluciones de miel oscila entre 3.2 y 5.5 con un valor medio de 3.9, variación que depende del origen botánico del producto, siendo inferior en muestras de naturaleza flora y superior a 4.0 para muestras de miel de mielada (Salamanca et al., 2004).

2.1.5.14. Hidroximetilfurfural (HMF)

El 5-Hidroximetil-2-Furaldehído o Hidroximetilfurfural más conocido como HMF es el más importante producto intermedio de la reacción del ácido-catalizado por la degradación de hexosas y/o reacción de Maillard; este parámetro de calidad permite medir la frescura de la miel, el envejecimiento natural en los productos alimenticios, evaluar daños térmicos

ocasionados en caso de que hayan sido sometidas a procesos de industrialización con calor excesivo (daños térmicos). La acción del calor produce alteraciones o destrucción de los componentes sensibles al calor como deshidratación de sus azúcares monosacáridos (principalmente D-fructosa) en medio ácido, en forma total o parcial. La intensidad del calentamiento afecta las características sensoriales, terapéuticas, antisépticas, enzimáticas y provoca la pérdida de elementos nutritivos (vitaminas) afectando la calidad de la miel. El HMF ocurre naturalmente en la mayoría de las mieles y usualmente se incrementa con el tiempo y tratamientos térmicos de la miel (Salamanca et al., 2004). Se ha considerado un excelente método para apreciar la calidad y frescura de la miel; su excesiva cantidad implica un oscurecimiento del color y una pérdida de frescura de la miel. Las mieles en su mayoría sufren el proceso natural de cristalización a muy pocos días de ser cosechada y pasa a un estado sólido. Ante la preferencia del mercado por mieles en estado líquido, la miel se calienta perdiendo sus propiedades; es aquí que adquiere valor e importancia la medición del HMF (Valega 2009). A partir de los 60°C la miel puede incrementar la cantidad. El HMF es de alta toxicidad, es nocivo para la salud y la ingestión de mieles con alto contenido de HMF puede ocasionar problemas gastrointestinales (Tosi et al., 2002).

2.1.5.15. Enzimas de la miel

Las enzimas son sustancias de naturaleza proteica, provocan y aceleran reacciones químicas. Se producen principalmente en las glándulas hipofaríngeas de las abejas obreras y son termolábiles. Las que se encuentran en la miel actúan en especial sobre los glúcidos; las principales son la diastasa (a-amilasa), encargada de hidrolizar el almidón y procede también del néctar; la invertasa (a-glucosidasa), responsable del desdoblamiento de la sacarosa en fructosa y glucosa y la glucosaoxidasa, que actúa sobre la glucosa produciendo ácido glucónico, principalmente responsable de la acidez de la miel. Esta enzima se inactiva a 60 °C, por lo que es un indicador de que la miel haya podido ser calentada o que este envejecida (Persano, 2002).

La actividad de diastasa incluye la acción de dos enzimas presentes en la miel, las cuales son la alfa amilasa y la beta-amilasa. La función de estas enzimas es hidrolizar el almidón. Primero actúa la enzima alfa-amilasa que hidroliza el almidón y produce dextrinas (cadenas de glucosa). A medida que se van generando dextrinas, actúa la beta-amilasa sobre los extremos no reductores de las cadenas de glucosa generando maltosa (Belitz

y Grosch, 1997). La reacción de hidrólisis de almidón es llevada a cabo por la enzima amilasa (Diastasa) el almidón no hidrolizado absorbe en la superficie el reactivo de yodo, produciendo una coloración morada. En la determinación de la actividad de diastasa se coloca como sustrato almidón y se incuba con la muestra de miel, se produce la hidrólisis enzimática del almidón, la cual se determina al añadir el reactivo de yodo, que produce coloración, con el remanente de almidón no hidrolizado. La disminución del color que ocurre en los tubos después de incubarlos, respecto del tubo control, es una medida de la actividad diastasa de la muestra, que se expresa en unidades de diastasa o unidades Göthe. Se considera que una actividad de diastasa baja implica que la miel ha sido sobrealentada o mal almacenada. Mientras mayor es el contenido de esta enzima, mayor es su calidad. Además, la cantidad de diastasa está relacionada con la variedad botánica procedente (Kadar et al., 2010).

2.2. Color

La miel puede ser casi incolora, rojo ámbar (miel de flores), pardo claro, verdoso hasta negro (miel de mielada). El color de la miel está relacionado con la presencia de pigmentos de flores también influye la reacción de Maillard que ocurre por condensación de azúcares con grupos amino libres, aminoácidos y proteínas (Fattori, S. 2004). La coloración de las mieles es un dato importante al ser una característica física que depende del origen del producto. Es un criterio útil para la clasificación de las mieles monoflorales, que van desde color blanco agua, tonos ámbar a casi negro, con posibles matices típicos en algunos tipos de miel, como el amarillo brillante, rojizo o verdoso; la fijación de los precios depende en gran medida del color de la miel; las mieles claras como cítricos y acacia, logran los precios más altos (Bogdanov et al., 2004; Montenegro et al., 2005). El color de la miel no es un factor de calidad, pero sí es una característica para efectos de presentación comercial exigido por compradores. Las distintas tonalidades de la coloración ámbar de la miel están expresadas en siete tipos de color presentados en el cuadro 4, adoptados oficialmente por el Departamento de Agricultura del Gobierno Federal (U.S.D.A.). En general las mieles más claras presentan mayor contenido de monosacáridos, disacáridos como sacarosa y provitamina A, además de presentar una mayor probabilidad a cristalizar, muestran mayor concentración de H^+ y una mayor relación lactona/acidez libre. Ciertas características analíticas varían con el

color, el contenido de azúcares superiores, sustancias nitrogenadas y minerales es mayor en mieles oscuras, las actividades de invertasa y diastasa son mayores, la acidez libre y la acidez total aumentan a medida que aumenta el color (Fattori, S. 2004). Las causas de oscurecimiento en la miel han sido atribuidas a la reacción de Maillard, a la caramelización de la fructosa y a la producción de los polifenoles; sin embargo, no existen estudios sistemáticos en este tema. Las mieles más oscuras tienen mayor acidez, más alto contenido en elementos minerales y son más ricas en polisacáridos que las de color claro (Kek et al., 2014; Chuttong et al., 2016). El color de la miel está relacionado al origen floral (también relacionado con la presencia de minerales). Los minerales que se encuentran en la miel pueden provenir néctar, son capaces de formar compuestos pardos, se ha reportado que un mayor contenido de minerales influye en una pigmentación más intensa en la miel. Las condiciones de almacenamiento pueden influir en el color de la miel debido a que, si se almacena en recipientes metálicos no aptos para estar en contacto con alimentos componentes como azúcares, aminoácidos y polifenoles reaccionan con el hierro generando compuestos coloreados (Kek et al., 2017).

2.2.1. Sistema CIE Lab

Se basa en las propiedades físicas de longitud de onda, pureza de excitación e intensidad luminosa, que representan variables específicas y universales. El espacio de color $L^*a^*b^*$ Los tres ejes del sistema CIELabse indican con los nombres L^* , a^* , b^* y representan, respectivamente, luminosidad, tonalidad de rojo a verde y tonalidad de amarillo a azul (los dos últimos ejes están inspirados en la teoría de los colores oponentes). Los colores que están en el eje L^* tienen las coordenadas a^* y b^* iguales a 0. Son colores acromáticos (blanco, negro y grises). Los valores situados en el eje L^* van de 0 (negro) a 100 (blanco).

2.3. Meliponicultura

La meliponicultura es una actividad cultural, económica y social que surge en las comunidades mayas antes de la conquista europea, según hallazgos de vestigios arqueológicos en Mesoamérica fechados para el periodo Protoclásico (Pat et al., 2018). La meliponicultura se dedica al cuidado, maneyo y cría de abejas sin aguijón, su nombre surge debido a la clasificación taxonómica de las abejas sin aguijón perteneciente a la tribu Meliponini. La práctica de domesticar abejas sin aguijón y utilizar sus productos se remonta a la época precolombina en América. La cultura maya, por ejemplo, se dedicaba

a la meliponicultura, no solo con fines alimentarios y medicinales, sino también por la miel y el propóleo que producían, que desempeñaban un papel en las ceremonias religiosas (Sanches et al., 2017).

Los mayas de la península cultivaron la *Melipona beebei*, o abeja real *Xunancab*; los totonacas y nahuas en el centro del país cultivaron la *Scaptotrigona mexicana*, o *Pisil nejmej*. Existen datos que nos permiten saber que los antiguos mayas de la península llegaron a conformar extensos meliponarios con hasta 500 colmenas (Zepeda, 2022).

Actualmente, en la península de Yucatán persiste la meliponicultura; a la vez, varias especies de abejas sin aguijón son criadas por meliponicultores en estados de la costa del Golfo de México como Tabasco, Veracruz, Campeche y Quintana Roo; en la costa del Pacífico en Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Nayarit y Sinaloa. Sin embargo, la meliponicultura en el país aún es una práctica a muy pequeña escala que no cuenta con apoyo suficiente. Esta situación favorece que una parte importante de la producción de miel y cera provenga todavía de la destrucción de nidos silvestres.

Actualmente, la meliponicultura ha retomado importancia, como parte de la revalorización de la cultura maya, y las propiedades curativas que se le atribuyen, por mencionar algunas, la actividad antioxidante, antitumoral, antimicrobiana, entre otras (Ramos, 2021).

La meliponicultura usa cientos de especies de abejas sin aguijón. Por esta razón, no es posible establecer prácticas de manejo comunes para trabajar de manera uniforme todas las especies de abejas sin aguijón. El cuidado de meliponarios suele ser fácil; se puede considerar como una fuente de ingresos complementaria. Las colmenas de abejas sin aguijón no representan riesgos; se consideran sostenibles para el medio ambiente, además de favorecer a la polinización (Rosso & Nates-Parra, 2006).

Luego de su cosecha, las mieles tropicales de abejas sin aguijón producen espuma debido a su elevado tenor de humedad respecto a mieles de *A. mellifera* (Pérez-Pérez et al., 2007)

2.4. Abejas

Las abejas son importantes polinizadores, esenciales en los ecosistemas terrestres porque tienen un papel ecológico importante en la reproducción de las plantas y son vitales para los sistemas agrícolas productores de alimentos (Ayala & Ortega, 2018).

Actualmente existen más de 20,000 especies de abejas registradas en el mundo. El 95% de dichas especies comprende a abejas solitarias; solamente el 5% a abejas sociales, que son las que viven en colonias organizadas donde almacenan alimento (Zepeda, 2022). Las abejas nativas se clasifican como insectos y son parientes cercanos de las avispas y las hormigas. La principal diferencia entre las abejas nativas, también llamadas “meliponas” y las abejas europeas (*A. mellifera*), está dada por el hecho de no presentar un aguijón con veneno como mecanismo de defensa. Además, las abejas nativas suelen ser más peludas y robustas (con excepción de las abejas angelitas) y generalmente las alas son más cortas que el cuerpo (Zepeda, 2022). Por otro lado, los nidos o colmenas de las abejas nativas son construidos en posición horizontal dentro de troncos o algún espacio hueco que encuentren disponible. Además, las abejas nativas construyen una estructura característica en la entrada del nido denominada piquera, la cual varía en forma y tamaño dependiendo del tipo de abeja. La colmena o nido de las abejas nativas protege la cría y brinda refugio para almacenar el alimento (Zepeda, 2022).

Las abejas sin aguijón son un grupo diverso de himenópteros distribuidos ampliamente en las regiones tropicales (de Jesús, 2009). A diferencia de la abeja *A. melífera*, la abeja con aguijón europea generalmente más conocida, los meliponinos de América son abejas nativas, de las que se han identificado más de 400 variedades. En México están reportadas 46 diferentes abejas sin aguijón de la tribu *Meliponini* (Zepeda, 2022). Son el único grupo de abejas nativo de América tienen comportamiento social, se comunican y forman colonias, en su estructura se encuentran la reina, obreras y zánganos (Rosso & Nates-Parra, 2006).

La especie *Melipona beecheii Bennett* es de particular importancia por la cantidad de miel que produce y porque aún se cultiva. La miel de abejas sin aguijón es diferente a la que producen las abejas del género *Apis* (es decir, la abeja melífera) en cuanto a su color, sabor y viscosidad (Rao et al., 2016). La especie de abeja más común utilizada para la producción de miel y otros productos apícolas (es decir, polen, cera de abejas, propóleos y jalea real) es la especie *A. mellifera L.*, seguida de las abejas sin aguijón (Rozman et al, 2022) Ambas abejas se clasifican en la familia *Apidae* y la subfamilia *Apinae* , pero la abeja melífera europea más popular se clasifica en la tribu *Apini* , género *Apis* , especie *mellifera* , mientras que las abejas sin aguijón se clasifican dentro de la tribu *Meliponini* (Kek et al., 2014) que tiene diferentes géneros que incluyen *Melipona* , *Scaptotrigona* y

Trigona (Ali et al., 2020) Hay más de 500 especies de abejas sin aguijón que se encuentran en regiones tropicales y subtropicales, y la mayoría de estas especies se encuentran en América Latina, África, Asia y Australia (Chuttong et al., 2016, Abd et al., 2017). Se ha demostrado que los géneros y especies de abejas tienen un impacto significativo tanto en el contenido fenólico como en los parámetros fisicoquímicos de la miel (Nordin et al., 2018) pero esto no se ha estudiado extensamente.

2.4.1. *Scaptotrigona mexicana*



Figura 1. Cajón mortorio, nido y potes con miel de *S. mexicana*.

Autoría propia

En México se han identificado 46 especies de abejas sin aguijón, una de las cuales es *Scaptotrigona mexicana* (*S. mexicana*). La abeja eusocial sin aguijón *S. mexicana* es endémica de México y Guatemala (Gutierrez et al., 2002). La abeja *S. mexicana* fue utilizada por las sociedades precolombinas de México para producir miel y cerumen, y aún se maneja en los estados de Veracruz, San Luis Potosí, Hidalgo, Yucatán y Puebla (Xolalpa-Aroche et al., 2024). Estas abejas son considerados importantes polinizadores de muchas flores silvestres y cultivos tropicales importantes, especialmente en el café neotropical, la macadamia, el mango y la vainilla en México la vainilla por lo que tienen relevancia ecológica y económica (Gutierrez et al., 2002; Vit et al., 2004). La miel de *S. mexicana* es

muy demandada en los mercados de alimentos ecológicos por su calidad ya que se considera un alimento funcional debido a su composición química; está principalmente compuesta por carbohidratos y otros componentes como agua, vitaminas, minerales, proteínas, enzimas, ácidos orgánicos, aminoácidos y compuestos fenólicos (Jiménez et al., 2016). El contenido de compuestos fenólicos y la composición fisicoquímica de la miel de abejas sin aguijón varía entre géneros y especies de abejas, pero esto no ha sido ampliamente estudiado (Nordin et al., 2018). Además, parámetros como la humedad, el

hidroximetilfurfural (HMF), la acidez, la actividad de agua y la actividad de la diastasa no se han establecido específicamente para la miel de las abejas sin aguijón (Chuttong et al., 2016). La falta de legislación sobre la miel de abejas sin aguijón y de información sobre su valor nutricional afecta a los productores y a la comercialización de esta miel en el mercado mundial (Kek et al., 2014). La composición fisicoquímica y bioactiva de la miel sin aguijón ha atraído el interés de los investigadores debido a su potencial en la prevención de enfermedades asociadas al estrés oxidativo (Lim et al., 2019). Hasta ahora, existen pocos estudios sobre las propiedades fisicoquímicas de la miel de *S. mexicana* (López-Garay et al., 2023). Los datos de composición química se limitan a fenólicos totales, carotenoides totales e identificación de ácido láctico y 5-(hidroximetil) furfural (HMF) (Vit et al., 2011).

2.5. Actividades biológicas de la miel

La miel es un alimento que posee múltiples beneficios biológicos, entre los cuales podemos destacar su capacidad antioxidante mediante la captación de radicales libres por acción de los compuestos fenólicos (Oliveira & González, 2012; Ruiz-Ruiz et al., 2017; Ramón-Sierra et al., 2020). Diversos estudios demuestran que la miel posee capacidad antibacterial (Hau-Yama et al., 2019; Chan-Rodríguez et al. 2012, Ruiz-Ruiz et al., 2017, Alvarez-Suarez, et al., 2017), antifúngica, (Hau-Yama et al., 2019; Ramón-Sierra, et al., 2019) antihipertensiva, antioxidante, (Erejuwa et al., 2012) antitumoral, antiinflamatoria, (Ruiz-Ruiz et al., 2017) antidiabética, anticancerígena utilizando líneas celulares (Vit et al., 2013; Ahmad et al., 2019; Mahmood et al., 2020). Dichas funciones se atribuyen se atribuyen a factores fisicoquímicos como la alta presión osmótica causada por la concentración de azúcar, pH bajo, peróxido de hidrógeno y actividad del agua (Hau-Yama et al., 2019). Los polifenoles pueden interferir distintas etapas que conducen al desarrollo de tumores malignos al proteger al ADN del daño oxidativo, inactivando de este modo los carcinógenos, inhibiendo la expresión de los genes mutágenos y de la actividad de las enzimas encargadas de la activación de procarcinógenos, y activando los sistemas enzimáticos responsables de la detoxificación de xenobióticos (Martínez-Valverde et al., 2000). Ali et al., (2020) demostraron la actividad antidiabética mediante la inhibición de la α -amilasa y α -glucosidasa mediante el uso de fenoles y flavonoides. Gharzouli et al., (2002) demostraron la actividad gastroprotectora proporcionando miel a ratas con daño

de úlceras en el estómago obteniendo resultados positivos en su estudio. Un estudio posterior (Al-Waili et al., 2006) demostró la capacidad hepatoprotectora de la miel. La miel de *S. mexicana* es muy valorada ya que tradicionalmente se ha utilizado con fines medicinales, se ha incorporado en el tratamiento de problemas respiratorios, trastornos digestivos y heridas. Esta miel también es conocida por sus propiedades antimicrobianas (Vit et al., 2004). Otros estudios científicos han confirmado su potencial antimicrobiano y antioxidante (Jimenez et al., 2016).

2.5.1. Actividad antioxidante

La capacidad antioxidante descrita para distintos polifenoles se puede considerar como la actividad biológica responsable del efecto preventivo que se les atribuye sobre determinadas enfermedades como son la enfermedad cardiovascular y el cáncer epitelial. Los antioxidantes son compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas mediante la inhibición de la reacción de oxidación. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se ha relacionado con su potencial para quitar metales y captar radicales libres (Martínez-Valverde et al., 2000). Los iones, de metales como hierro y cobre, pueden acelerar la producción de radicales libres. La capacidad quelante de los flavonoides sobre ellos parece contribuir a su actividad antioxidante *in vitro*. En organismos vivos, la mayoría del hierro y el cobre están enlazados a las proteínas, limitando su participación en las reacciones que producen radicales libres. Aunque las actividades metalquelantes de los flavonoides pueden ser beneficiosas en condiciones patológicas de exceso de hierro o de cobre (Salido & Fernández, 2005). Entre los compuestos fenólicos con una reconocida actividad antioxidante destacan los flavonoides, los ácidos fenólicos (principalmente hidroxicinámico, hidroxibenzólico, caféico, clorogénico), taninos (elligataninos), calconas y cumarinas, los cuales constituyen la fracción polifenólica de una gran diversidad de alimentos (Martínez-Valverde et al., 2000). Para comprender mejor la actividad fisiológica de estos compuestos se debe tener en cuenta que la capacidad antioxidante varía en función del grupo de compuestos estudiados y de su solubilidad en fase acuosa o lipídica. Asimismo, la gran diversidad de métodos empleados proporciona resultados numéricos distintos difíciles de comparar. Para solventar este problema en la mayoría de los estudios científicos en los que se valora la actividad antioxidante bien de compuestos puros, bien

de extractos vegetales, se utiliza el Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7 ,S-tetrametilcroman-2-carboxílico) como patrón, sustancia que se caracteriza por ser un análogo hidrosoluble de la vitamina E (Martínez-Valverde et al., 2000).

2.5.1.2. Flavonoides

Los flavonoides poseen una gran capacidad antioxidante como resultado de su estructura química. Así el grupo 0- difenol en el anillo B, el doble enlace en las posiciones 2 y 3 conjugados con la función 4-oxo, y los grupos hidroxilos en las posiciones 3 y 5 (Figura 2) presentan capacidad para secuestrar radicales libres. La quercitina es un flavonoide

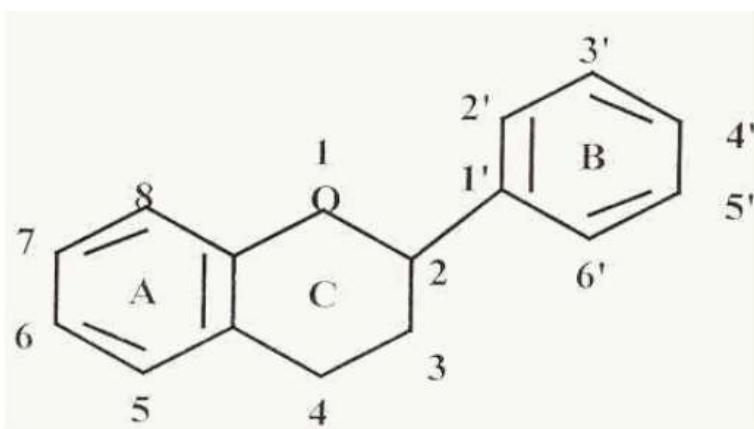


Figura 2. Estructura general de un flavonoide (Martínez-Valverde et al., 2000).

con un número idéntico de grupos hidroxilo en la misma posición que la catequina, conteniendo también un 2,3 doble enlace en el anillo C y la función 4-oxo. Esta ligera modificación en la estructura ocasiona una considerable diferencia en sus valores de actividad antioxidante. Este hecho se debe a que la molécula

de azúcar reduce la eficacia antioxidante de los grupos hidroxilos adyacentes debido a ser un obstáculo estérico (Martínez-Valverde et al., 2000).

2.5.2. Actividad antidiabética

En 2021 se estima una prevalencia de diabetes de 10,5 % (536,6 millones de personas en todo el mundo) y se prevé que aumente hasta el 12,2 % (783,2 millones) en 2045 (Sun et al., 2022). La diabetes mellitus es un trastorno metabólico que se caracteriza por un aumento de los niveles de glucosa en sangre (Ali et al., 2020). A lo largo de los años, se han desarrollado varios enfoques terapéuticos para los pacientes con diabetes mellitus. Una estrategia para reducir la hiperglucemia posprandial en la diabetes mellitus tipo II consiste en prevenir la absorción de carbohidratos después de la ingesta de alimentos (Sabiu et al., 2016).

Algunos tratamientos se han centrado en enzimas clave en la diabetes mellitus tipo II, como la lipasa, la α -glucosidasa y la α -amilasa (Thummajitsakul, et al., 2019).

2.5.2.1. α amilasa

La α -amilasa es una enzima digestiva que cataliza la descomposición del almidón en maltosa y, finalmente, en glucosa, que es el único azúcar que puede ser utilizado por el organismo (Kotowaroo, *et al.*, 2016). La inhibición de la α -amilasa reduce el número de monosacáridos, en particular la glucosa, que pueden absorberse (Noh *et al.*, 2020). Varios estudios han demostrado la relación entre el contenido fenólico total y la actividad inhibidora de la amilasa (Thummajitsakul, *et al.*, 2019; Cheng *et al.*, 2023).

2.5.3. Actividad gastroprotectora

Existen diversas afecciones del tracto gastrointestinal como dispepsia, úlcera estomacal, gastritis, duodenitis, ulceración y cáncer, se ha informado que todas tienen en común como gente causal la presencia de la bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (Eusebi *et al.*, 2014). Se ha reportado el uso de la miel como tratamiento natural viable en la erradicación de *H. pylori* debido a su posible inhibición del crecimiento del microorganismo (Ali *et al.*, 1991). En ese contexto, la miel de Manuka resultó efectiva en la inhibición contra *H. pylori* probada en ensayos *in vitro* (McGovern *et al.*, 1999; Voidarou, *et al.*, 2021)

2.5.3.1. *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es un bacilo gramnegativo, en forma de bastón o espiral que se caracteriza por su preferencia de ambientes microaerófilos (Eusebi *et al.*, 2014) que coloniza selectivamente la mucosa gástrica humana, afectando a más del 50% de la población mundial con una prevalencia global que oscila entre el 28% y el 84% dependiendo de la región. (Stingl & de Reuse, 2004; Ramírez & Sánchez, 2008; Jia *et al.*, 2022). Se considera una de las infecciones bacterianas crónicas más comunes en los seres humanos (Saleem & Howden, 2020). La infección por *H. pylori* representa una amenaza significativa. En 2018 se estimó que fue causa de alrededor de fuertemente asociada a diversas enfermedades incluyendo gastritis, úlceras gástricas y duodenales, desarrollo de cáncer gástrico y linfoma del tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (Remírez & Sánchez, 2008; Fallone *et al.*, 2016).

En términos de salud pública, *H. pylori* se identificó como causante de aproximadamente 810000 nuevos casos de adenocarcinoma gástrico no cardias, convirtiéndose en la principal causa de cáncer atribuible a infecciones (de Martel et al., 2020). Actualmente *H. pylori* se ha clasificado como carcinógeno tipo I y se reconoce como la causa principal de cáncer gástrico. La carcinogénesis inducida por *H. pylori* se explica por diversos mecanismos fisiopatológicos. La bacteria provoca inflamación crónica de la mucosa gástrica que puede evolucionar hacia gastritis atrófica y metaplasia intestinal, estados considerados como factor de riesgo para el desarrollo de cáncer. Además, la infección puede generar inestabilidad genética en el epitelio gástrico al reducir la secreción de ácido (hipoclorhidria), lo cual favorece el crecimiento de un microbioma alterado (Lee et al., 2016). La erradicación de *H. pylori* ha demostrado reducir significativamente el riesgo de desarrollar cáncer gástrico, lo que la convierte en una estrategia viable de prevención primaria (Lee et al., 2016). Sin embargo el tratamiento continúa siendo un desafío ya que implica regímenes prolongados de 10 a 14 días con múltiples fármacos. La eficacia de estos tratamientos ha disminuido debido al incremento de la resistencia bacteriana (Jia et al., 2022). Por lo que en los últimos años se han desarrollado programas con el objetivo de erradicar *H. pylori* para prevenir el cáncer gástrico (Savoldi et al., 2018).

2.5.3.2 Ureasa

La ureasa (urea amidohidrolasa, EC 3.5.1.5) es una enzima fundamental que cataliza la hidrólisis de la urea, generando amoníaco y carbamato, el cuál se descompone espontáneamente en una segunda molécula de amoníaco y ácido carbónico. En soluciones acuosas, tanto el ácido carbónico y las moléculas de amoníaco alcanzan un equilibrio entre sus formas protonadas y desprotonadas, lo que provoca un incremento neto del pH. Esta capacidad de neutralizar la acidez convierte a la ureasa en un determinante esencial de la virulencia bacteriana y un elemento indispensable para la colonización de la mucosa gástrica (Mobley et al., 2001). Además de su papel en la hidrólisis de la urea, la ureasa cumple una función protectora crucial al elevar el pH, permitiendo a las bacterias sobrevivir en ambientes altamente ácidos (Xiao et al., 2007). *H. pylori* es un claro ejemplo de esta adaptación, ya que posee una notable capacidad para colonizar el ambiente gástrico, un entorno extremadamente hostil para la mayoría de los microorganismos. Gracias a esta adaptación, la bacteria puede persistir durante toda la vida del huésped. En *H. pylori*, la ureasa constituye uno de los principales factores

de virulencia, destacando por su elevada abundancia y por presentar la mayor afinidad conocida hacia su sustrato. En diversos modelos animales, como ratones y lechones, la ausencia de actividad ureásica impide la colonización de la mucosa gástrica, lo que confirma su papel esencial en la supervivencia y adaptación de *H. pylori* al ambiente ácido del estómago (Stingl & de Reuse, 2005). La ureasa también desempeña un papel crucial en el metabolismo y la virulencia de *H. pylori*, actuando como un potente inmunógeno capaz de inducir una respuesta inmunitaria intensa. Además, su detección se utiliza con fines diagnósticos, taxonómicos y para el monitoreo posterior al tratamiento (Mobley et al., 2001). Entre los principales factores que regulan su actividad se encuentran el pH, la disponibilidad de su sustrato (urea) y la presencia de su cofactor esencial, el níquel (Stingl & de Reuse, 2005).

Durante las últimas décadas se han evaluado distintos inhibidores de la ureasa, como la fluorofamida, las hidroxiureas y los ácidos hidroxámicos. Sin embargo, muchos de ellos han sido descartados para uso *in vivo* debido a problemas de toxicidad o inestabilidad. Un ejemplo es el ácido acetohidroxámico, el cual mostró efectos teratogénicos en estudios con animales. Por ello, las investigaciones actuales se enfocan en el desarrollo de nuevos inhibidores con mejor biodisponibilidad y menor toxicidad (Xiao et al., 2007).

En este sentido, los polifenoles han adquirido una creciente relevancia científica. Diversos estudios epidemiológicos, ensayos en modelos animales y experimentos *in vitro* han demostrado que estos compuestos poseen múltiples actividades biológicas, entre ellas propiedades anti cancerígenas, antiinflamatorias, antibacterianas, cardioprotectoras e inhibidoras de enzimas. En consecuencias, se ha incrementado el interés por explorar el potencial de los polifenoles como agentes naturales en la inhibición de la ureasa y en la modulación de diversos procesos patológicos (Xiao et al., 2007).

2.6. Microbiota intestinal

El intestino humano contiene alrededor de 100 billones de microorganismos vivos que lo convierten en un verdadero ecosistema, por lo que los microorganismos presentes en el intestino tienen un papel fundamental en el estado nutricional e inmunológico del hospedador (Guerrero, 2014), se considera esencial para la absorción eficiente de nutrientes y para el mantenimiento de la salud en general. La evidencia ha indicado que el microbioma intestinal influye fuertemente no solo en la homeostasis energética sino

también en el estado inflamatorio en el cuerpo humano (Ranneh et al., 2021). Todos estos microorganismos residentes en nuestro organismo se denominan microbiota (Ballesteros & González, 2018). La microbiota intestinal se puede definir como el conjunto de comunidades de microorganismos vivos colonizadores del intestino (Fontané, et al., 2018), está formada por 100 billones de bacterias de aproximadamente 400 especies distintas. Las primeras bacterias que colonizan el tubo digestivo son aeróbicas, principalmente *E. coli* y otras del género *Lactobacillus* (Creus, E. G. 2004). Investigaciones recientes muestran que el 80-90% de los filotipos de bacterias del intestino humano son miembros de dos filos, Bacteroidetes (gramnegativos, e.g. Bacteroides y Prevotella) y Firmicutes (grampositivos, e.g. *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*) seguidos de las Actinobacterias (gramnegativas, e.g. *Bifidobacteria*) y las Proteobacterias (gramnegativas, e.g. *Helicobacter*, *Escherichia*) (Fontané et al., 2018).

La microbiota tiene una función triple: protectora, trófica y metabólica. Ejerce un efecto barrero y protector contra patógenos. En su función trófica, controla la proliferación y diferenciación de las células epiteliales intestinales y contribuye al desarrollo y homeostasis del sistema inmune. Es más reciente el reconocimiento de su función metabólica, que incluye la fermentación de residuos no digeribles de la dieta y de moco endógeno (Ballesteros & González, 2018). La importancia de la microbiota radica en la implicación que tiene en el metabolismo del ser humano, ya que participa en la modulación de la nutrición del huésped y del consumo de energía a través de la producción de vitaminas (K, ácido fólico y B12), absorción de electrolitos y minerales, fermentación de componentes indigeribles de la dieta por el huésped y producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC); además influye en la homeostasis del epitelio intestinal, desarrollo del sistema inmunitario, protección frente a patógenos o metabolismo de fármacos (Fontané, et al., 2018). Las primeras bacterias que colonizan el tubo digestivo son aeróbicas, principalmente *E. coli* y otras del género *Lactobacillus*. Posteriormente, y de modo progresivo, se van estableciendo especies anaerobias, en especial los géneros *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium* y *Bifidobacterium* (Creus, 2004). La microbiota intestinal es capaz de hidrolizar enlaces glucosídicos (esto ocurre de manera natural en durante el consumo de alimentos) mediante la producción de β -

glucosidasa, β -glucuronidasa and β -galactosidasa dando lugar a compuestos potencialmente cancerígenos (Hatakka et al., 2008).

2.6.1. Probióticos

Los probióticos fueron definidos por Lilly y Stillwell, en 1965 como factores de origen microbiano que estimulan la proliferación de otros organismos (Guarmer et al, 2011). La OMS define a los probióticos como los microorganismos vivos no patógenos que cuando son administrados en cantidad adecuada confieren un efecto beneficioso sobre la salud del huésped (Olveira Fuster & González-Molero, 2007). Los microorganismos deben estar correctamente identificados, carecer de factor de virulencia y de producir metabolitos indeseables, mostrar tolerancia a condiciones de estrés gastrointestinal y verificar su funcionalidad. Los géneros, especies y cepas (designación alfa numérica) más usados para consumo, pueden ser de origen humano, y superviven en el tránsito del tubo gastrointestinal (Castañeda, 2018). A estas bacterias se les realiza un proceso de selección (*screening*), evaluando su capacidad de resistir al pH ácido del estómago y a las enzimas digestivas y sales biliares del intestino, y de adherir al mucus o a las células epiteliales intestinales (Cáceres & Gotteland 2010) Las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las más usadas como probióticos (Guarmer et al, 2011).

Dentro de la especie *Lactobacillus* se distinguen las cepas: *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. plantarum* y *L. reuteri*, entre otras.

Los probióticos se consideran un vehículo de sustancias terapéuticas que se liberan para prevenir o tratar alguna enfermedad (Guerrero, 2014); participan en la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas agudas digestivas (Castañeda, 2018). Éstos compiten por los nutrientes y por los sitios de adhesión, e inhiben la proliferación de microorganismos patógenos. También estas especies pueden sintetizar ácidos orgánicos que reducen el pH intestinal y retardan el crecimiento de bacterias patógenas sensibles al pH (Creus, 2004), previenen enfermedades crónicas intestinales y hepáticas, actúan sobre la función inmune del huésped y la homeostasis intestinal, y pueden modular la microbiota intestinal (Castañeda, 2018). También se han identificado actividades antioxidante, anti-inflamatoria, inmunoestimulante, antitumoral, analgésica, entre otros (Cáceres & Gotteland, 2010). El mecanismo de acción de los prebióticos va de acuerdo a la cepa (dosis, viabilidad, propiedades, duración y forma de administración). La cantidad necesaria de probióticos depende de la cepa y el producto en el que se encunetra. En

promedio se ha reportado un rango de 1–10 miles de millones de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), sin embargo se ha demostrado su eficacia a niveles inferiores (Guarmer et al., 2011). Así mismo, el término “cantidades adecuadas”, se refiere a la dosis a ingerir, la cual es medida en unidades formadoras de colonias (UFC), de importancia para la efectividad del producto, con presentación de un mínimo de 1×10^9 UFC por preparación, pues al no cumplimentar el requisito definido no se cumplimenta el efecto terapéutico en alimentos (Castañeda, 2021). Los probióticos pueden ser considerados como “ingredientes funcionales” que se utilizan para hacer “funcional” un alimento es decir agregar una propiedad funcional definida que le otorga un valor agregado al producto (Cáceres & Gotteland 2010). Los probióticos plantean ser una solución para diversas problemáticas que enfrenta México, entre ellas, un índice alto de obesidad. Se ha documentado que el uso de probióticos puede mejorar el metabolismo de la glucosa con un efecto potencialmente mayor cuando la administración de probióticos es mayor a ocho semanas o existe un consumo de múltiples especies de probióticos (Castañeda, 2021). Ejtahed, et al., (2012) reportaron una disminución de los niveles de HbA1c posterior a la ingesta de yogur, que contenía *L. acidophilus* y *B. lactis*, lo que aporta evidencia de que el uso de probióticos tiene propiedades antidiabéticas y antioxidantes. Los probióticos aumentan la secreción de péptido 1 similar al glucagón de las células L enteroendócrinas para mejorar el metabolismo de los hidratos de carbono, disminuir la glucotoxicidad y aumentar la sensibilidad a la insulina de las células diana.

2.6.2. Bacterias ácido lácticas

Este grupo comprende una clasificación funcional de bacterias no patógenas y no toxigénicas, conformado por 12 géneros de bacterias Gram positivas (Jay, 2002). Se caracterizan por ser fermentativas y por producir ácido láctico a partir de carbohidratos, útil en la industria de alimentos. Dentro de este destacan los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, y *Streptococcus thermophilus*. El género *Bifidobacterium*, aunque posee relevancia en la salud instestinal, no se incluye dentro de las bacterias ácido lácticas (BAL), ya que no participa directamente en la fermentación de alimentos y presenta diferencias taxonómicas con respecto a las demás BAL. Cabe señalar que muchos probióticos pertenecen a este grupo, aunque existen otros probióticos —como ciertas

cepas de *Escherichia coli*, bacterias formadoras de esporas y levaduras— que no son consideradas BAL (Guarmer et al., 2011).

Las bacterias ácido lácticas, entre ellas las del género *Lactobacillus*, han sido utilizadas durante milenios en la conservación de alimentos mediante fermentación, desempeñando una doble función: actuar como agentes fermentadores y, al mismo tiempo, contribuir potencialmente al bienestar y la salud humana. (Guarmer et al, 2011). Dichas bacterias fermentadoras carecen de sistemas de transporte de electrones funcionales ligados al heme o de citocromos, obtienen su energía por fosforilación a nivel del sustrato a la vez que oxidan carbohidratos (no tienen un ciclo de Krebs funcional).

Se ha dividido a las bacterias ácido lácticas en dos grupos basados en los productos finales del metabolismo de la glucosa:

- Homofermentativas: producen ácido láctico como producto principal o único, pueden extraer dos veces más energía de la glucosa. Se observa con el metabolismo de la glucosa, pero no de la pentosa. Se caracterizan los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, y algunos *Lactobacillus*
- Heterofermentativas: Son bacterias lácticas que producen cantidades equimolares de lactato, dióxido de carbono y etanol de las hexosas. Constan de *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Carnobacteria* y algunos *Lactobacillus* (Jay, 2002).

Las bacterias ácido lácticas tradicionales, son consideradas seguras para el consumo humano incluidas en alimentos y suplementos (Guarmer et al, 2011).

Las BAL pueden ayudar a prevenir el estreñimiento y regular el tiempo de tránsito, prevenir la diarrea y el cáncer de colon, reducir los niveles de lípidos en sangre y estimular el sistema inmunológico al aumentar la actividad fagocítica de los macrófagos y las células T y B (Oršolić et al., 2017).

2.6.3. *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* actualmente contiene más de 180 especies gram positivas, anaerobias facultativas o microaerófilas, bacterias en forma de varilla, no formadoras de esporas, y abarca una amplia variedad de organismos que representan la mayor parte del grupo de bacterias del ácido láctico (es decir, convierten los azúcares en ácido láctico) (Capuro, et al., 2019) se utilizan en la fabricación y fermentación de alimentos (Savijoki, et al., 2011).

El género *Lactobacillus* puede crecer en el rango de pH de ácido leve a valores neutros su nivel óptimo de pH es de 5,5 a 6,2 y temperaturas de 2 a 53 °C, con óptimo rango de temperatura de 30 a 40 °C (Kaprasob, et al., 2017)

El género *Lactobacillus* se ha subdividido en tres géneros: *Betabacterium*, *Streptobacterium* y *Thermobacterium*.

Las estreptobacterias producen aproximadamente un 1.5% de ácido láctico (*L. casei* y *L. plantarum*) con un temperatura óptima de 30 °C.

También ha sido organizado basado en sus características fermentativas:

- Grupo 1- especies homofermentativas estrictas (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, etc.) son termobacterias y no fermentan pentosas.
- Grupo 2- especies heterofermentativas facultativas, fermentan pentosas (*L. casei*, *L. plantarum*, etc.)
- Grupo 3- especies heterofermentativas estrictas, producen CO2 de la glucosa (*L. fermentum*, *L. reuteri*, etc.) (Jay, 2002).

Algunas cepas de *Lactobacillus* pueden prevenir una amplia gama de enfermedades, condiciones o síndromes en humanos (Savijoki, et al., 2011).

Se ha demostrado que el un microorganismo *Lactobacillus rhamnosus* es capaz de estimular una respuesta inmunitaria con aumento de IgA, IgG, IgM, y mejora la función intestinal maduración y producción de IgA. El mecanismo de acción previamente descrito es debido a que hay una mejora de la barrera epitelial, el aumento adhesión a la mucosa intestinal, inhibición concomitante de adhesión de patógenos, exclusión competitiva de microorganismos patógenos, producción de sustancias antimicroorganismos y modulación del sistema inmunológico. También son capaces de inhibir la producción de lipopolisacáridos (LPS) y factor de necrosis tumoral (TNF)- α en macrófagos; y funcionan como anatibacterial (Capuro et al., 2019).

Algunas cepas de *Lactobacillus* son conocidas por producir enzimas activas como amilasa, β -glucosidasa, descarboxilasa, lactato deshidrogenasas, peptidasa, ácido fenólico descarboxilasas, fenol reductasa, proteinasa y tanasa y estos tienen relevancia para diversas biotransformaciones de sustratos alimentarios (Kaprasob, et al., 2017).

Algunas cepas específicas de *Lactobacillus* como (*L.*) *gasseri*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, y *L. acidophilus* han reportado disminuir la actividad de las enzimas β -glucuronidasa, β -glucosidasa, nitroreductasa, and azoreductasa en humanos (Hatakka et al., 2008)

Valero-Cases et al., (2017) mencionan que durante la fermentación de alimentos por bacterias del ácido láctico puede suceder una conversión microbiana de polifenoles.

2.6.4. *Lactobacillus rhamnosus*.

Es el probiótico mejor estudiado, con más de 100 ensayos clínicos publicados que han estudiado sus efectos sobre la salud. Numerosos estudios han evaluado los efectos de *L. rhamnosus* sobre la diarrea disminuyendo el riesgo de estos episodios. Ha sido probado en el manejo nutricional de pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas del tubo digestivo o con alergia. También modula el sistema inmune, aumentando la concentración de IgAs a nivel intestinal y disminuyendo los niveles fecales de marcadores de la inflamación como TNF- α y α 1-antitripsina. Se ha desmotrado su poder en la reducción del riesgo de caries (Cáceres & Gotteland 2010). La cepa *L. rhamnosus* es capaz de ayudar a mejorar los índices metabólicos en pacientes con sobrepeso y obesidad ya que apoyan en la degradación de azúcares y grasas, además de algunas proteínas entre otros, que permiten una mejor digestión ayudando también a mejorar la asimilación de nutrientes y disminuyendo la cantidad de azúcares en la sangre que es el principal problema relacionado con enfermedades consecuencia de obesidad y sobrepeso (Carranza-Volquarts et al., 2018).

Estudios demuestran que el consumo de probióticos como *L. rhamnosus* pueden reducir adiposidad, peso y el aumento de peso en pacientes con obesidad.

Lactobacillus rhamnosus GG. LC-705 es un cultivo de bacterias del ácido láctico bioprotector, utilizado para fermentar productos lácteos, es una bacteria grado alimentario es capaz de unirse a las células intestinales (Erkkilä, et al., 2001; El-Nezami et al., 2002) y sobrevivir al tracto gastrointestinal (Hatakka, et al., 2008). La cepa de *Lactobacillus* LC-7058 es capaz de adherirse al tejido intestinal (Hatakka et al., 2008)

La cepa Lc705 puede ejercer actividades inhibidoras de levaduras y mohos y propiedades bioprotectoras cuando se usa en fermentados (Savijoki, et al., 2011).

2.7. Fermentación

Es un proceso mediante el cual los microorganismos son capaces de transformar alimentos en nuevos compuestos, generalmente a través de la generación de ácido láctico, etanol u otros metabolitos derivados de su actividad metabólica (Guarner et al., 2011). La fermentación ácido-láctica de alimentos procedentes de plantas parece que fue

incorporado por los homínidos aproximadamente 1,5 millones de años a.n.e. Esta práctica fue ampliamente usada en Europa hasta la revolución industrial y todavía hoy en día, es empleada habitualmente ya que es una forma segura y simple de conservar los alimentos (Olveira Fuster & González-Molero, 2007). La fermentación de los alimentos aporta sabores característicos y disminuye el pH, lo que contribuye a prevenir la proliferación de microorganismos patógenos. Además, en ciertos caso puede incrementar el contenido de vitaminas (Jay, 2002). La fermentación se aplica en todo el mundo para la preservación de una serie de productos agrícolas sin procesar (cereales, raíces, tubérculos, frutas y hortalizas, leche, carne, pescado, etc.) (Guarmer et al, 2011). Cuando las materias primas son ácidas y contienen azúcares libres, las levaduras crecen enseguida y el alcohol que producen limita las actividades de los organismos contaminantes. Para llevar a cabo la fermentación se debe aportar una fuente exógena de enzima sacarificantes (Jaay, 2002). La transformación de los azúcares produce principalmente ácido láctico por la acción de las bacterias ácido lácticas, en cantidades menores: ácido acético, alcoholes y ésteres; dependiendo de la cepa también se puede originar anhídrido carbónico e hidrógeno (Guerrero, 2014). La miel después de ser almacenada mediante, microorganismos, principalmente bacterias del género *Bacillus* y levaduras, son capaces de consumir parte del azúcar y transformarlo en alcohol a través de la fermentación anaeróbica y luego este alcohol se transforma en ácido acético a través de fermentación aeróbica. El azúcar también se puede transformar en otros tipos de ácidos (y otros subproductos) como otros tipos de bebidas no alcohólicas (Souza et al., 2021).

Actualmente se han desarrollado otros procesos de fermentación para aumentar la síntesis de microbios biológicamente activos metabolitos para diversos beneficios funcionales utilizando sustratos o nutrientes apropiados y con el objetivo microbiano adecuado. Entre estos se distinguen a la fermentación basada en bacterias del ácido láctico (LAB) que contribuye a mejorar el valor nutricional y la digestibilidad de varios alimentos, disminuir la intolerancia a la lactosa, controlar el potencial infecciones y, además, tiene relevancia para agregar más bioactivos funcionales (Kaprasob, et al., 2017). Valero-Cases et al., (2017) mencionan que durante la fermentación de alimentos por bacterias del ácido láctico puede suceder una conversión microbiana de polifenoles. *L. rhamnosus* experimenta una inhibición en su crecimiento cuando se acumula en

exceso su producto principal, el ácido láctico, debido a la disminución del pH, que afecta directamente su desarrollo. A valores de pH más bajos, el proceso de fermentación se prolonga, se reduce el consumo de glucosa y, en general, la productividad del cultivo disminuye (Gonçalves, Ramos, Almeida, Xavier, & Carrondo, 1997).

Kaprasob, et al., 2017 realizaron un estudio que indicó que los restos bioactivos como la vitamina C y los compuestos fenólicos y los antioxidantes asociados pueden ser modulado beneficiosamente a niveles más altos en la mayoría de los casos, pero incluso cuando reducida en el caso de actividad antioxidante y recuentos viables al final de 48 h se mantienen los beneficios agregados generales de la fermentación inducida por LAB. Algunas cepas de *L. rhamnosus* presentan una capacidad limitada o nula para fermentar la sacarosa, mostrando un metabolismo lento e ineficiente tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Estas cepas muestran un mejor crecimiento cuando utilizan azúcares simples, como la glucosa y la fructosa, como fuentes de carbono (Hedberg, Hasslöf, Sjöström, Twetman y Stecksén-Blicks, 2008). La falta de actividad frente a la sacarosa sugiere que carecen de la capacidad enzimática necesaria para hidrolizar este disacárido.

3. OBJETIVOS

3.2. Objetivo general

Evaluar el efecto de la adición de *Lactobacillus rhamnosus* en un proceso de fermentación controlada en miel de *Scaptotrigona mexicana* para incrementar sus propiedades funcionales.

3.3. Objetivos específicos

1. Analizar el efecto general de las diferencias en parámetros fisicoquímicos, compuestos bioactivos y de actividad antioxidante entre la miel de *A. mellifera* y la miel de abejas sin aguijón mediante una revisión sistemática para cuantificar la magnitud del efecto de la especie de abeja en la miel.
2. Caracterizar las muestras de miel mediante los métodos de la AOAC para identificar sus parámetros fisicoquímicos relacionados con la calidad de la miel.
3. Evaluar la incorporación de *Lactobacillus rhamnosus* en miel de *Scaptotrigona mexicana* mediante un proceso de fermentación controlada para evaluar el incremento de sus propiedades funcionales mediante el análisis de actividad antioxidante
4. Evaluar la bioactividad de los compuestos presentes en la miel a través de la inhibición enzimática de la α -amilasa y la ureasa, con el propósito de determinar su potencial actividad antidiabética y gastroprotectora mediante modelos *in vitro*.

4. HIPÓTESIS

La adición de *Lactobacillus rhamnosus* en un proceso de fermentación controlada en miel de *Scaptotrigona mexicana* incrementará sus propiedades funcionales, mejorando su contenido de compuestos bioactivos y su capacidad antioxidante en comparación con la miel sin fermentar.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el desarrollo de la investigación se realizaron tres etapas que se describen a continuación:

5.2. Primer etapa: Revisión sistemática y metaanálisis

Diseño del estudio: Revisión sistemática con metaanálisis.

Fuente de datos: Búsqueda estructurada de artículos científicos utilizando el protocolo predeterminado de acuerdo con los Elementos de Informe Preferidos para Revisiones Sistemáticas y Meta-análisis (PRISMA) y el protocolo se registró utilizando la plataforma Open Science Framework (<https://osf.io/s9zt8>). La búsqueda se enfocó en estudios que comparaban el contenido de compuestos fenólicos, la actividad antioxidante y la composición fisicoquímica de la miel de *A. mellifera* versus la miel producida por abejas sin aguijón.

5.3. Segunda a etapa: Caracterización fisicoquímica

Se empleó un diseño completamente al azar, en el que se analizaron 24 muestras de miel. Se realizó un análisis exploratorio y descriptivo. A cada unidad muestral se le realizó análisis fisicoquímico y funcional por triplicado. Además, se realizó la identificación de compuestos aromáticos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masa (GC-MS) y un análisis metabolómico no dirigido usando espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).

5.4. Tercera etapa: Fermentación controlada y bioactividad.

Para la segunda fase del experimento se aplicó un diseño de bloques completamente al azar, en el cual el tratamiento consistió en la fermentación controlada de miel con la concentración óptima previamente definida, mediante la adición de *Lactobacillus rhamnosus*. Este tratamiento fue aplicado a tres mieles provenientes de diferentes regiones (el tamaño de la muestra se calculó mediante el tamaño del efecto) consideradas como bloques, con el propósito de controlar la variabilidad natural asociada al origen botánico y geográfico de las muestras.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2. Primera etapa

6.2.1. Revisión sistemática y metaanálisis

6.2.1.1. Estrategia de búsqueda

Para recolectar los datos, obtuvimos publicaciones científicas de varias bases de datos, incluyendo Google Scholar, Primo-UAEH, PubMed y DOAJ. La búsqueda de artículos fue realizada por tres investigadores para evitar el sesgo del revisor. Se desarrolló una estrategia de búsqueda utilizando los siguientes términos: “miel”, “abejas sin aguijón”, “*Apis mellifera*”, “flavonoides”, “fenoles”, “actividad antioxidante” y “composición fisicoquímica”, en combinación con los operadores booleanos ('y' u 'or'). Además, se identificaron algunos artículos de las listas de referencias de los artículos encontrados en la búsqueda inicial y se incluyeron en la base de datos completa (Figura 3).

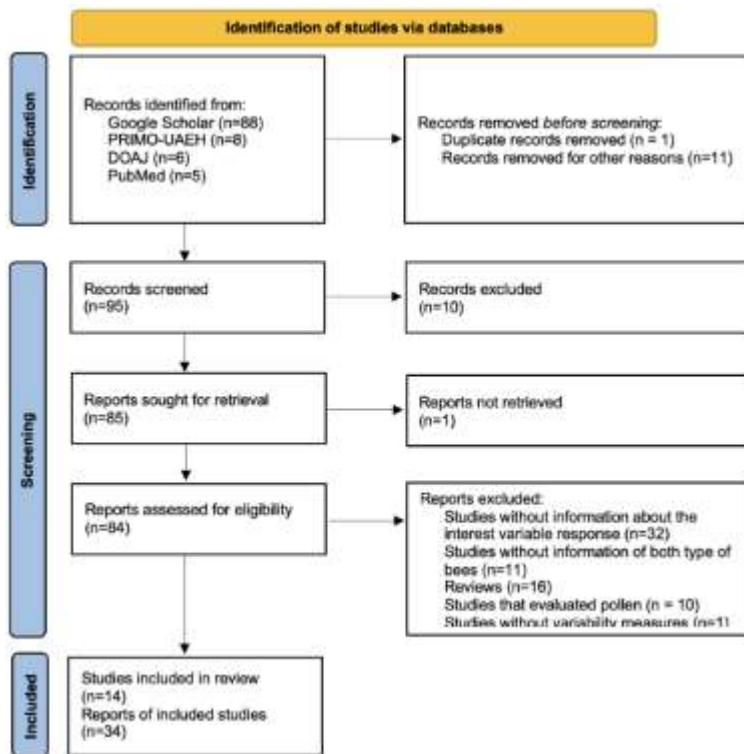


Figura 3. Diagrama de flujo del estudio de elementos de informe preferidos para revisiones sistemáticas y metanálisis (PRISMA) de la revisión sistemática desde la búsqueda y selección inicial hasta la selección final de publicaciones que se incluirán en el metanálisis.

6.2.1.2. Metaanálisis

Se implementó un modelo de efectos aleatorios, que asumió que la diferencia observada entre los estudios era una combinación de azar y variación genuina en los efectos de la intervención. El tamaño del efecto (ES) se calculó y se informó como la diferencia de medias estandarizada (SMD) y la diferencia de medias bruta (RMD) (Hedges, 1981; Appuhamy et al., 2013). Todos los análisis se realizaron en el entorno R para el cálculo estadístico (versión 04.2+764, R Core Team, 2024) utilizando el paquete 'meta' versión 4.13-0.

6.2.1.3. Heterogeneidad

La heterogeneidad se evaluó mediante la estimación de la varianza de efectos aleatorios entre estudios (t^2) y el porcentaje de variabilidad explicada por la heterogeneidad en lugar de la varianza simple (índice I^2), que representa la proporción de variabilidad entre estudios y se calcula de la siguiente manera (Higgins et al., 2003).

$$I^2 = \frac{Q - (k - 1)}{Q} \times 100$$

Donde:

Q es el estadístico de heterogeneidad χ^2 y k es el número de ensayos. Los valores de I^2 del 25 %, 50 % y 75 % representan niveles de heterogeneidad pequeños, moderados y altos, respectivamente.

6.2.1.4. Metarregresión

Los modelos multipredictores se redujeron manualmente mediante la selección regresiva de variables hasta que todos los predictores resultaron significativos ($p < 0,05$). Se construyeron modelos de regresión de efectos mixtos (análisis de metarregresión) con el paquete "metafor". Los modelos se compararon y seleccionaron mediante criterios de teoría de la información, utilizando el Criterio de Información de Akaike y el Criterio de Información Bayesiano. Asimismo, se evaluó la bondad de ajuste mediante el coeficiente de correlación análogo (R^2) para la metarregresión, que se calculó de la siguiente manera:

$$R^2 = \frac{\tau^2_{REM} - \tau^2_{MEM}}{\tau^2_{REM}}$$

Es la heterogeneidad total del modelo de regresión de efectos mixtos. Para evaluar la evidencia de sesgo de publicación, se realizaron pruebas de (Begg, 1994). El análisis de sensibilidad se realizó mediante un metanálisis de exclusión de uno.

6.3. Segunda Etapa

6.3.1. Obtención de la muestra

Se cosecharon 24 muestras de miel de origen multifloral de abeja *S. mexicana* en abril de 2024, directamente de colmenas manejadas por meliponicultores de ocho localidades del bosque cálido-húmedo y templado subhúmedo templado de Puebla, México (Tabla 1 y Figura 4). Todas las muestras se recolectaron en campo y almacenadas a 4°C en recipientes de ámbar y herméticos marca “Uline”.

Tabla 1. Características de los sitios de muestreo, incluyendo ubicación, número de muestras de miel, latitud-longitud, altitud (msnm), temperatura (°C), clima y precipitación media anual (mm).

Locación	Muestra	Latitud – Longitud	Altitud	Temperatura (°C)	Clima	Precipitación (mm)
La Palmilla	6	20.018477, -97.145660	147	23 - 32	Cálido-húmedo	1500
Ayahualo	5	19.971886, -97.325348	603	17.5-28.5	Cálido-húmedo	1270
Hueytamalco	4	19.940156, -97.288513	862	17.5-28.5	Cálido-húmedo	1270
Rancho viejo	3	19.445556, -96.781389	753	17.5-28.5	templado subhúmedo	1270
Cruz Blanca	3	19.893000, -97.288383	1238	17.5-28.5	templado subhúmedo	1270
Limontitan grande	1	19.991056, -97.275853	543	17.5-28.5	templado subhúmedo	1270
Tonalmecoyo	1	19.954604, -97.290276	737	17.5-28.5	templado subhúmedo	1270
Tacuba	1	19.976806, -97.313148	533	17.5-28.5	templado subhúmedo	1270

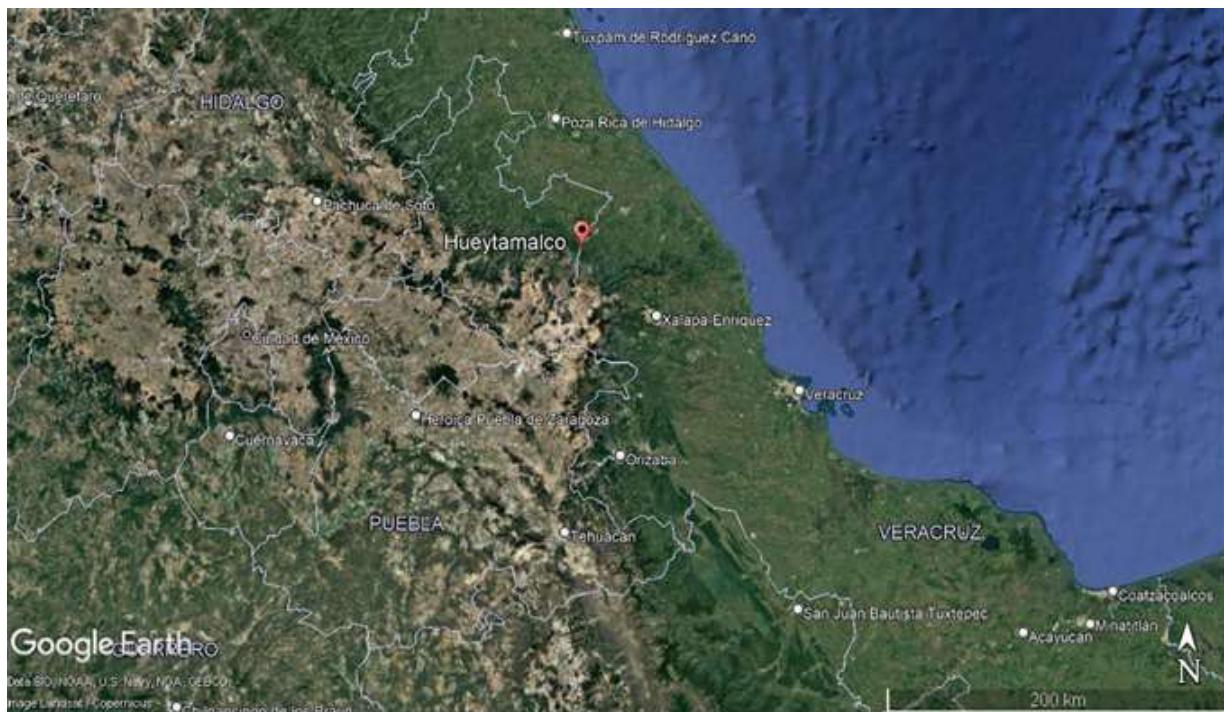


Figura 4. Mapa que indica el sitio en el que fueron recolectadas las muestras de miel de *Scaptotrigona mexicana*. Map data © 2025 Google.

6.3.2. Análisis fisicoquímicos

Preparación de la muestra.

Miel líquida: Homogenizar por agitación.

Miel parcial o totalmente cristalizada: se colocaron en un envase cerrado a baño María a una temperatura de 40°C hasta fundición total, se mezcló bien y se enfrió rápidamente (en caso de impurezas se filtró).

6.3.2.1. Humedad

El contenido de humedad se cuantificó de acuerdo con el método de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC, 2000). Para la calibración del equipo se añadió agua al refractómetro a una temperatura de 20°C. Posteriormente de homogenizó la muestra y colocó en los prismas del refractómetro y se efectuó la lectura del refractómetro.

6.3.2.2. Cenizas.

Para la determinación de cenizas la metodología se siguió de acuerdo con la AOAC (2005), se colocó 1 g de muestra homogenizada en una cápsula de platino. Se evaporó la muestra a baño María a una temperatura entre 60 - 65°C. El residuo seco se calcinó

en la mufla a una temperatura entre 600 °C hasta la presencia de cenizas blancas. Se determinó el peso del residuo seco de la muestra. El contenido de cenizas se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$C = \frac{m_2 - m}{m_1 - m}$$

Donde:

C= Contenido de cenizas en la muestra de miel en porcentaje

m = peso de la cápsula vacía en gramos

m1 = peso de la cápsula con la muestra en gramos

m2= peso de la cápsula con las cenizas en gramos

6.3.2.3. Actividad de diastasa

La actividad diastasa se determinó de acuerdo con la metodología de la AOAC (método 958.09) se disolvieron 5 g de miel con 10 ml de agua destilada, se añadieron 2.5 ml de solución tampón. Se agregaron 1.5 ml de solución de cloruro sódico. Despues, la solución se colocó en un baño de agua con 5 ml de solución de almidón a 40° C durante 15 min. A continuación, se añadió la solución de almidón a la solución de miel con agitación constante y se dejó reposar durante cinco minutos. Se tomó un ml y se añadieron 10 ml de solución diluida de yodo, se mezcló y se midió su absorbancia a 660 nm el espectrofotómetro UV/Vis (modelo 6715, Bibby Scientific Ltd, 2014, Reino Unido). Se tomaron alícuotas de 1 ml hasta que la absorbancia fue inferior a 0.235. La actividad diastasa se obtuvo mediante la siguiente formula:

$$AD = \frac{300}{T}$$

Donde:

AD= número de diastasa (este número expresa la actividad de la enzima en ml de solución al 1% hidrolizada por la enzima contenida en 1 gramo de miel). Este índice de diastasa corresponde al número de la escala de Göthe.

T= tiempo en minutos al que se obtuvo la absorbancia < 0.235

6.3.2.4. Hidroximetilfurfural (HMF)

El HMF se determinó de acuerdo con la norma oficial mexicana (NOM-004-SAG/GAN-2018). Se disolvieron 5 g de miel en 25 ml de agua destilada. Posteriormente, se midió la

absorbancia a 284 y 336 nm frente a una solución filtrada y tratada con NaHSO₃, utilizando un espectrofotómetro UV/Vis (modelo 6715, Bibby Scientific Ltd, 2014, Reino Unido). El HMF se calculó utilizando la siguiente formula:

$$HMF = (Abs\ 284 - Abs\ 336) * 149.7 * 5\ D/P$$

Donde:

D = factor de dilución

P = peso de la muestra en gramos

6.3.2.5. Azúcares reductores

La determinación de azúcares reductores se realizó por titulación en la que el cambio colorimétrico de la reacción indicó el porcentaje de concentración de azúcares reductores en la muestra. La reacción se realizó con la muestra de miel (0.5%) como valorante, que reduce el cobre (color azul) al punto de ebullición del reactivo de Fehling (44.21 mg/mL sulfato de cobre y 346 mg/mL tartrato de sodio y potasio + 100 mg/mL de hidróxido de sodio) en óxido cuproso (color rojo) utilizando como indicador azul de metileno al 0.1% (Cruz et al., 2014). Para el análisis de azúcares reductores, se pesaron 2.5 g de muestra de miel, disueltos en 50 mL de agua destilada agua, se pipeteó una alícuota de 10 ml de la solución de muestra, y se realizó una dilución a 200 mL con agua destilada. Esta solución se tituló con 10 mL de reactivo de Fehling (Silva et al., 2021).

6.3.2.6. Acidez libre y pH

Para obtener el pH, se colocaron 10 g de miel en un vaso de precipitado, se añadieron 75 ml agua destilada, se homogenizó la mezcla y se utilizó el potenciómetro para realizar la lectura de pH. Posteriormente, se determinó la acidez libre de la muestra por titulación, se agregó NaOH 0.05 N a una velocidad de 5 cm³/min y se detuvo cuando se alcanzó un pH de 8.5. Inmediatamente se añadieron 10ml de NaOH 0.05N y se agregó 1 ml de HCl 0.005 N, posteriormente se tituló con ácido clorhídrico 0.05 N empleando una bureta hasta obtener un valor de pH de 8.3. El volumen total requerido en el procedimiento de titulación se utilizó para el cálculo de la acidez libre, representada como miliequivalentes por kg de miel (Cruz et al., 2014).

6.3.2.7. ° Brix

Los grados Brix, se determinaron de acuerdo con la metodología propuesta por la norma mexicana (NOM-004-SAG/GAN-2018), se utilizó un refractómetro digital (Atago, PAL-3),

el refractómetro fue calibrado colocando una gota de agua destilada en el lente, y se ajustó a cero. Se colocó 1g de miel para cubrir completamente la superficie del lente y se efectuó la lectura.

6.3.2.8. Actividad de agua

La actividad del agua de las muestras se determinó utilizando un medidor de aw (Novasina Lab Touch-aw meter,) de acuerdo con Smetanska et al. (2021).

6.4. Compuestos bioactivos

6.4.1. Obtención de extractos

Se realizaron extractos metanólicos de miel, se pesó 1 g de miel se colocaron en un tubo falcon (50 mL) y se añadieron 10 mL de metanol al 80%. La mezcla se agitó continuamente con un agitador durante 2 horas.

6.4.2. Contenido total de fenoles

El contenido fenólico total de las muestras investigadas se midió por el método de Folin-Ciocalteu. La determinación de compuestos fenólicos totales en los extractos de miel se realizó mediante el método descrito por Smetanska et al. (2021). Una alícuota de 100 μ L del extracto se mezcló con 500 μ L de reactivo de fenol Folin-Ciocalteu (diluido 1:10 con agua) y se dejó reposar durante 7 minutos a temperatura ambiente; se agregaron 4 ml de solución de bicarbonato de sodio al 7% a la mezcla y se dejó reposar durante 120 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 760 nm. Se realizó una curva de calibración, se utilizó ácido gálico como estándar, para expresar los resultados obtenidos como miligramos equivalentes de ácido gálico (mg EAG).

6.4.3. Contenido total de flavonoides

El contenido de flavonoides se realizó mediante el método descrito por Smetanska et al. (2021). Se utilizó una solución de tricloruro de aluminio ($AlCl_3$) al 2% en metanol. Posteriormente se agregaron 2 ml del extracto de miel en un tubo de ensayo; se adicionaron 2 ml de $AlCl_3$, se dejó reposar durante 10 minutos; La concentración se calculará como mg equivalentes de quercetina (EQ) /kg de miel usando Quercetina para calcular la curva estándar (20– 100 μ g/ml).

6.5. Determinación del contenido de antioxidantes

6.5.1. Ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

El contenido de antioxidantes se determinó utilizando el método de Hernández-Fuentes et al. (2021). Se preparó una solución de DPPH 0,2 mM, se pesaron 7,8 mg de radical DPPH y se disolvieron en 100 mL de metanol (80%), la mezcla se agitó en la oscuridad durante dos horas para la disolución completa. Posteriormente, se añadieron 2.5 ml de solución metanólica de DPPH a un tubo de ensayo, se agregaron 0.5 ml de solución de miel, y la mezcla se dejó en la oscuridad por 30 minutos posteriormente se midió la absorbancia a 515 nm. La actividad antioxidante se determinó utilizando una curva estándar con ácido gálico. Los resultados se expresaron en miligramos EAG/ 1 g de miel.

6.5.2. Ensayo ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina 6-sulfónico)

Se pesaron 7 μ M de radical ABTS que se hicieron reaccionar con persulfato de potasio 2,45 μ M en una proporción de 1:1 y se agitó durante 16 horas en la oscuridad. Cuando el radical se formó, se diluyó con etanol (20%) hasta alcanzar una absorbancia de 0,7 \pm 0,01 a 734 nm. Una vez estabilizado el radical, se colocaron 3 ml de esta solución en un tubo de ensayo, y se añadieron 100 μ L de extracto de miel. La mezcla se agitó y se midió la absorbancia después de 10 minutos de reacción. La absorbancia de la solución diluida en etanol (20%) se usó como blanco. Se realizó una curva estándar con ácido ascórbico, por lo tanto, los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico EAG/ 1 g de miel.

6.6. Análisis de resonancia magnética nuclear (RMN 1 H)

Para la preparación de la muestra, se preparó una solución de patrón interno con 5,75 mM de sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil) propiónico-2,2,3,3-d4 (TSP, 98 % átomo de D, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, EE. UU.) en agua deuterada (99,9 % D₂O, Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, EE. UU.). A continuación, se transfirieron 900 μ L de miel y 100 μ L de solución de patrón interno a un criovial y se agitó en vórtex durante 30 segundos; 600 μ L de esta solución se transfirieron a un tubo de RMN de 5 mm. Los experimentos de RMN- 1 H se realizaron a 300 K en un espectrómetro Avance III HD de 700 MHz (Bruker, Billerica, MA, EE. UU.), equipado con una criosonda TCI de gradiente en el eje z de 5 mm y un muestreador automático SampleJet. Los datos se registraron

automáticamente bajo el control de ICON-RMN (Bruker, Billerica, MA, EE. UU.). Los espectros de RMN de ^1H se adquirieron con la secuencia Bruker noesygppr1d; las señales de agua y etanol se suprimieron mediante la aplicación de un pulso conformado modulado durante un retardo de relajación (D1) de 4,0 s y un tiempo de mezcla (D8) de 0,01 s. (García-Aguilera et al., 2023).

6.7. Tercer etapa

6.7.1. Cepa bacteriana

Se utilizó un cultivo liofilizado de *L. rhamnosus* LC705 (Raff Lactoingredientes, México) se rehidrató usando 1% (p/v) en caldo MRS como medio de cultivo, y se incubó durante 24 h a 37° C. El cultivo de *L. rhamnosus* se subcultivó (37° C, 18 h) dos veces en caldo MRS al 1% (v/v) de inóculo para activación y adaptación.

6.7.2. Preparación del medio MRS para la fermentación

El medio MRS fue modificado para analizar el crecimiento de *Lactobacillus*. Para la preparación se utilizaron 10 g de peptona de carne, 8 g de extracto de carne, 4 g de extracto de levadura, 5 g de acetato de sodio, 2 g de fosfato dipotásico y citrato de amonio, 1 g de Tween 80, 0,20 g de sulfato de magnesio y 0,05 g de sulfato de manganeso. Todos los reactivos se disolvieron en 1 litro de agua destilada. Posteriormente la mezcla se dejó a ebullición durante 1 minuto y luego se esterilizó en autoclave a 120°C durante 15 minutos. El medio MRS se almacenó en 2-8°C para su conservación durante 24 h antes de la inoculación de las cepas para garantizar que no se produjera contaminación (crecimiento de microorganismos no deseados) durante la preparación del medio (Das et al., 2015).

6.7.3. Fermentación

Se ajustó el porcentaje de inóculo al 10% v/v, para iniciar la fermentación. Para esto, se prepararon 90 ml de caldo MRS estéril y se adicionaron 10 ml del inóculo probiótico. Se utilizó como control positivo caldo MRS estándar con glucosa (20g/L), como control negativo se utilizó el medio basal sin glucosa. Para determinar patrón de cinética de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus*, la miel de *S. mexicana* fue suplementada al 5%, 10%, 15%, 20% y 25% (v/v) en caldo MRS modificado. Todos los matraces se incubaron anaeróbicamente cerrados a 37 C durante 48 h en un baño de agitación. El crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* se midió espectrofotométricamente a 600 nm a intervalos de 6 h utilizando caldo esterilizado como blanco (Das et al., 2015). Durante la fermentación se realizaron muestreros cada 6 horas hasta las 48 horas. El metabolismo de la cepa probiótica de prueba en los medios de cultivo que contenían miel y los medios de control positivo se evaluó mediante la medición de fenoles totales. Flavonoides, pH, el contenido de azúcares y ácidos orgánicos en diferentes intervalos de tiempo (0 justo

después de la homogeneización y después de 6, 12, 18, 24 y 48 h de incubación). La determinación microbiológica de la viabilidad de cada cultivo se realizó después del periodo de incubación, considerando el total de microorganismos viables mediante siembra en placa. Se expresó como Logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro (Log ufc/mL). (Guzmán-Armentero, et al., 2016).

6.7.4. Ensayo in vitro de inhibición de la alfa-amilasa

El ensayo de inhibición de α -amilasa se llevó a cabo en extractos acuosos de miel de *S. mexicana* se basó en el método de Uddin et al., (2022) con modificaciones. La reacción se realizó con 100 μ L de diluciones de extracto de miel (20, 40, 60, 80 y 100 μ g/mL) se mezcló con 100 μ L de solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.02 mol/L (pH de 6.9) se añadieron 100 μ L de solución amortiguadora de α -amilasa pancreática porcina (1 U/mL), y se preincubó a 37 °C durante 10 min. Tras el tiempo de preincubación, se añadieron 100 μ L de solución acuosa de almidón (1 %) y se incubó a 37 °C durante 60 min. La reacción se detuvo con 1 mL de reactivo de ácido dinitrosalicílico (DNS). Los tubos de ensayo se incubaron en un baño de agua a 90 °C durante 5 min y se enfriaron inmediatamente a temperatura ambiente en un baño de hielo. Posteriormente se agregaron 5 mL de agua destilada y se midió la absorbancia espectrofotométricamente a 540 nm (espectrofotómetro Jenway 6715, Staffordshire, ST15 OSA, Reino Unido). Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de Inhibición (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del blanco}} \right) * 100$$

El porcentaje de inhibición de la glucosidasa se tradujo en concentración efectiva al 50 % (EC50), que es la concentración de la muestra para una inhibición de la glucosidasa del 50%.

6.7.5. Cinética de la inhibición de la alfa-amilasa

Los experimentos cinéticos se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita por Thummajitsakul et. al., (2024) con algunas modificaciones. Estas consistieron en aplicar una inhibición independiente de la concentración, utilizando el inhibidor/extracto en su valos de EC50, el cual se incubó con la enzima α -amilasa. La concentración del sustrato (almidón) se ajustó en un rango de 0,2-1 mM/mL, permitiendo que la reacción procediera en las condiciones previamente establecidas. El 1/V (O.D.540nm/ min) 1 y 1/[substrato]

se utilizaron para generar el gráfico de Lineweaver-Burk. A continuación se calcularon Km (constante de Michaelis-Menten) y Vmax (velocidad máxima).

6.7.6. Ensayo in vitro de inhibición de la ureasa

El ensayo se realizó según el método descrito por Sahin et al. (2016). La reacción se inició mezclando 100 μ L de solución enzimática (ureasa de Jack Bean, 8 U/mL) con 100 μ L de solución inhibidora (0,5 mM), seguido de una incubación a 37 °C durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 200 μ L de tampón fosfato (pH 6,8) que contenía urea (100 mM) y la mezcla se incubó de nuevo a 37 °C durante 30 minutos. A continuación, se detuvo la reacción añadiendo 600 μ L de H₂SO₄ al 4 %. Posteriormente, se añadieron 500 μ L de reactivo fenólico (reactivo A: 5 % p/v de fenol y 0,0005 % p/v de nitroprusiato de sodio) y 500 μ L de reactivo alcalino (reactivo B: 0,5 % p/v de NaOH y 0,1 % de NaOCl), seguido de una incubación durante 30 minutos a 37 °C. Se midió el aumento de la absorbancia a 630 nm utilizando un espectrofotómetro. Se utilizó tiourea como inhibidor estándar de la ureasa.

6.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

6.8.1. Primer etapa: Revisión sistemática y metaanálisis

El primer paso de la revisión analítica fue realizar un análisis descriptivo utilizando el paquete 'psych' versión 2.1.9 (Revelle et al., 2021) en el entorno de cálculo estadístico R. Para el metaanálisis se implementó un modelo de efectos aleatorios. El tamaño del efecto (ES) se calculó como la diferencia de medias estandarizada (SMD) y la diferencia de medias bruta (RMD) utilizando el paquete 'meta' versión 4.13-0. La heterogeneidad se evaluó mediante la estimación de la varianza de efectos aleatorios entre estudios (t^2) y el porcentaje de variabilidad explicada por la heterogeneidad en lugar de la varianza simple (índice I^2). Las variables explicativas de la heterogeneidad se analizaron mediante una metarregresión. Los modelos multipredictores se redujeron manualmente mediante la selección regresiva de variables hasta que todos los predictores resultaron significativos ($p<0.05$). Se construyeron modelos de regresión de efectos mixtos (análisis de metarregresión) con el paquete "metafor". Todos los análisis y gráficos se realizaron en el software Rstudio (versión 04.2+764, R Core Team, 2024).

6.8.2. Segunda etapa: Caracterización Fisicoquímica

Para los resultados de los parámetros fisicoquímicos, se utilizó la estadística descriptiva. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (DE). Posteriormente se realizaron pruebas de normalidad mediante gráfico QQ, cálculo de curtosis, asimetría y prueba de Shapiro. Los resultados mostraron que los datos no tenían una distribución normal por lo que se utilizaron pruebas no paramétricas para las comparaciones, mediante la prueba de Kruskal-Wallis ($p<0.05$) seguida de una prueba post hoc de Dunn con corrección de Bonferroni para discernir posibles diferencias entre las muestras. Las variables fenoles, flavonoides y actividad antioxidante (ensayos DPPH y ABTS) se agruparon por regiones. Se establecieron correlaciones mediante el coeficiente de Spearman entre los parámetros seleccionados ($p<0.05$). Para clasificar las muestras de miel en función de sus propiedades fisicoquímicas, se realizó un análisis de cluster jerárquico y un análisis de conglomerados. Se utilizó la distancia euclídea con la regla del enlace completo para calcular las similitudes de las muestras y un procedimiento aglomerativo jerárquico para establecer los conglomerados. Antes de realizar el análisis jerárquico de conglomerados, la matriz

de datos de las propiedades fisicoquímicas se autoescaló restando el valor medio de cada variable y dividiéndolo por su desviación estándar. Esto garantizó que todas las variables tuvieran la misma influencia en los resultados. Todas las pruebas se realizaron en la versión 2024.12.0+467 de R, utilizando los siguientes paquetes: dplyr, tidyverse, ggplot2, FSA, rstatix, psych, corrplot, stats.

6.8.3. Procesamiento de espectros de RMN ^1H

En los análisis de RMN se obtuvieron las desintegraciones por inducción libre (FID) que fueron transformadas por Fourier, se pusieron en fase, se corrigieron por línea base y se alinearon desplazando la señal TSP a cero, todo en modo automático con apodización de 0,3 Hz utilizando el software TopSpin v.3.5.6 (Bruker, Billerica, MA, EE. UU.).

6.8.3.1. Análisis de datos multivariados

Los datos de RMN- H^1 se reducieron generando binnings de 0,04 ppm en un rango de desplazamiento químico de 10,00-0,2 ppm, excluyendo las señales de agua (5,02-4,70 ppm) mediante alineación y normalización a TSP. Se emplearon el centro medio y la escala de Pareto para los análisis de PCA. La validación cruzada se realizó mediante persianas venecianas con 10 divisiones y un espesor ciego de uno para ambas técnicas. En cuanto a PARAFAC, los espectros se escalaron según Pareto antes del plegado de tres vías, y el modo de los espectros se restringió a la no negatividad en los análisis. Se empleó el software PLS-Toolbox 9.0 (Eigenvector Research, Inc., Wenatchee, WA, EE. UU.) para todos los análisis quimiométricos. Para los compuestos obtenidos RMN, se realizó un análisis multivariado como PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis) y un OPLS-DA (Orthogonal (Partial Least Squares Discriminant Analysis) con el programa SIMCA.

6.8.4. Tercer etapa: Fermentación

Para la cinética de crecimiento se utilizó estadística descriptiva. Los datos obtenidos de la fermentación con distintas concentraciones de miel (5%, 10%, 15%, 20% y 25%) se ajustaron a modelos de crecimiento bacteriano (modelo de Monod, modelo de Haldane y modelo de Gompertz modificado) y se compraron los parámetros cinéticos ($\mu_{\text{máx}}$, tiempo de latencia, densidad final). Se realizó el cálculo del sustrato óptimo para definir la mejor concentración de miel en el crecimiento bacteriano de *Lactobacillus rhamnosus*.

Para comparar el efecto de la fermentación en azúcares reductores, pH, acidez, fenoles, flavonoides, DPPH y ABTS, se realizó un análisis Pre-Post mediante un ANOVA de medidas repetidas y una comparación de medias por Dunn – Bonferroni ($p <0.05$) para identificar diferencias entre los distintos tiempos de fermentación.

Para los resultados de la inhibición de la enzima α -amilasa y ureasa se calculó el porcentaje de inhibición, se realizó un ANOVA para identificar si existían diferencias significativas ($p<0.05$) y prueba de Tukey. EC 50, se aplicó el modelo linearizado de Michaelis Menten para posteriormente obtener los parámetros de K_s y V_{max} , con lo que se determinó el tipo de inhibición de la enzima

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.2. Primer etapa: Revisión sistemática y metaanálisis

Se realizó una revisión analítica y un metaanálisis para evaluar el efecto del tipo de abeja (*A. mellifera* vs. abejas sin aguijón) sobre el contenido fenólico (fenoles y flavonoides), la actividad antioxidante (ensayos DPPH y FRAP) y la composición fisicoquímica (humedad, HMF, acidez libre, color y proteína) de la miel. Las principales causas de exclusión de artículos fueron estudios sin resultados para las variables de respuesta de interés ($n = 34$), artículos sin comparación de ambos tipos de abejas ($n = 11$), artículos de revisión ($n = 16$), estudios que evaluaron polen ($n = 10$) y artículos sin medidas de variabilidad ($n = 1$). Después de aplicar los criterios de inclusión y exclusión, se incluyeron en el metaanálisis un total de 14 artículos publicados entre 2000 y 2022 (Figura 3). Después de un análisis de sensibilidad utilizando el metaanálisis *leave-one-out*, el resultado agrupado se estabilizó.

7.2.1. Compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante

La RMD, SMD, heterogeneidad y sesgo de las variables de respuesta se presentan en la Tabla 2. La miel producida por abejas sin aguijón mostró un mayor contenido fenólico en comparación con la miel de *A. mellifera* con una RMD de +33,69 mg GAE/100 g ($p = 0,01$; IC 95% +7,11, +60,27 mg GAE/100 g) y una alta heterogeneidad ($\rho = 90,4\%$). El contenido de flavonoides en la miel de los diferentes géneros de abejas sin aguijón fue mayor (Figura 5) en comparación con la miel de *A. mellifera* en +3,59 mg QE/100 g ($p = 0,05$; IC 95% -0,01, +7,19 mg QE/100 g), con una alta heterogeneidad ($\rho = 89,3\%$) (Tabla 2).

Tabla 2. Diferencia de medias estandarizada (SMD) y diferencia de medias bruta (RMD) del modelo de efectos aleatorios con IC del 95% y una prueba de heterogeneidad de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y resultados de parámetros fisicoquímicos de la miel de *Apis mellifera* y abeja sin aguijón.

Variable	Ensayos (n)	<i>Apis mellifera</i>	Tamaño del efecto			Heterogeneidad		ρ valor p	p - Valor ^d
			RMD (IC del 95%) ^b	Valor p	SMD (IC del 95 %) ^c	Valor p			
			Media (DE) ^a						
Fenoles (mg GAE/100 g)	34	61.21 (28.30)	+33.69 (+7.11, +60.27)	0.01	+2.45 (-4.78, +9.70)	0.50	90.4	0.0001	0,21
Flavonoides (mg QE/100 g)	33	9.94 (8.7)	+3.59 (-0,01, +7.19)	0.05	+2.56 (-0.70, +5.83)	0.12	89.3	0.001	0.06

DPPH (μmol TE/100 g)	30	78.10 (20.21)	+37.57 (-13.60, 88.76)	0.15	+2.0 (-3.41, +7.41)	0.46	90.4	0.001	0.19
FRAP (μmol Fe(II)/100 g)	23	97.34 (7.84)	+63.39 (+15.52, +111.26)	0.009	+4.51 (+1.60, +7.42)	0.002	89.7	0.0001	0.08
Humedad (%)	31	19.54 (3.65)	+ 8.02 (+5.93, +10.11)	0.0001	+10.09 (+6.52, +13.66)	0.0001	92.6	0.0001	0.0006
HMF (mg/kg)	17	20.14 (16.27)	-11.25 (-15.88, -6.62)	0.001	-3.96 (-6.07, -1.85)	0.0002	93.5	0.0001	0.008
Acidez libre (meq/kg)	19	31.32 (16.67)	+34.76 (+7.17, +62.34)	0.01	+3,17 (-0,45, +6,81)	0.08	93.6	0.0001	0,52
Color (mm/Pfund)	18	64.48 (11.93)	+10.24 (-10.22, 30.71)	0.32	+6.31 (-12.23, -0.39)	0.036	95.1	0.0001	0.101
Proteína (g/kg)	22	3.49 (4.08)	-0.31 (-1.18, -0.55)	0.48	-0.83 (-3.98, +2.30)	0.60	92.6	0.0001	0.77

Media y desviación estándar de la miel de *Apis mellifera*. RMD es la diferencia de medias bruta que estima el efecto global expresado en las unidades de medida originales. SMD es la diferencia de medias estandarizada estimada del modelo aleatorio. *p*-valor de la prueba de Begg; *p*-valores > 0,05; *Q* es medida de heterogeneidad del modelo aleatorio.

La Figura 5 muestra la diferencia media en el contenido de flavonoides entre los dos tipos de miel, tanto de origen monofloral como polifloral. La miel de origen monofloral mostró una diferencia media de 13,22 (IC del 95 %: [13.15- 13.29]), lo que sugiere un mayor contenido de flavonoides en este tipo de miel y un efecto combinado de 6.07 (IC del 95 %: +0.48, +11.67). Los resultados muestran una diferencia significativa en la actividad antioxidante basada en los valores de FRAP entre los tipos de abejas, con un alto potencial antioxidante de la miel de abeja sin aguijón (+63,39 μmol Fe(II)/100 g; *p* = 0,009) (Tabla 2).

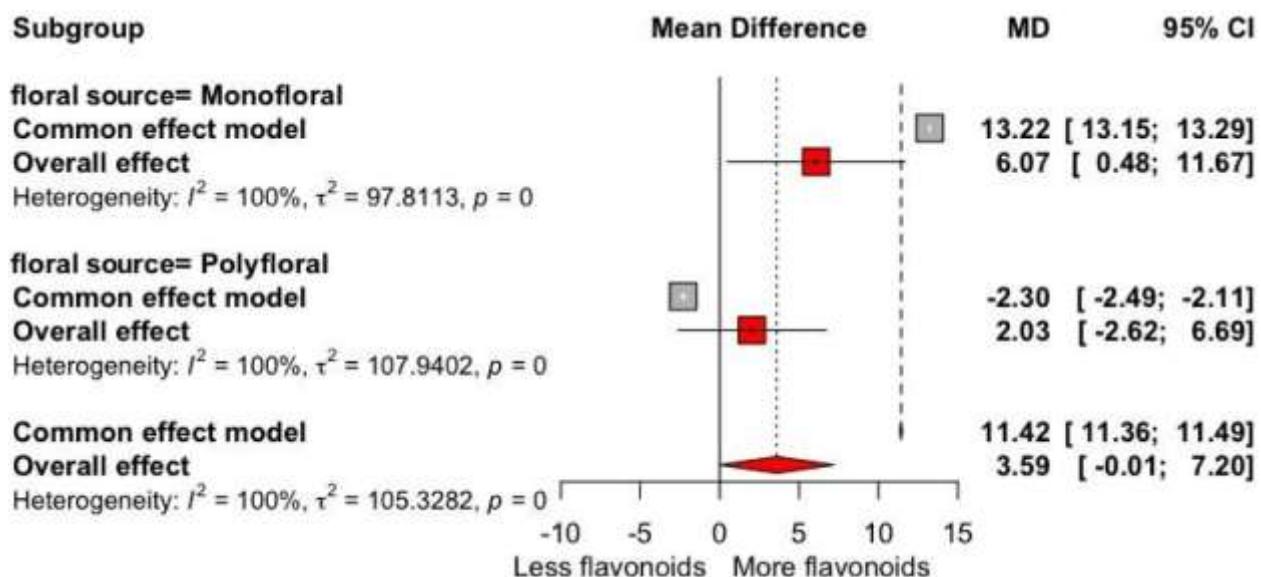


Figura 5. Diagrama de bosque del contenido de flavonoides (mg QE/100 g) para ensayos con fuentes florales, divididos en orígenes monoflORAles y multiflorales. El tamaño de punto refleja la ponderación relativa del estudio en la estimación del tamaño del efecto general, donde un tamaño de punto mayor representa una mayor ponderación en la estimación del tamaño del efecto combinado, incluyendo los intervalos de confianza. El diamante representa el efecto general como la diferencia de medias bruta (RMD).

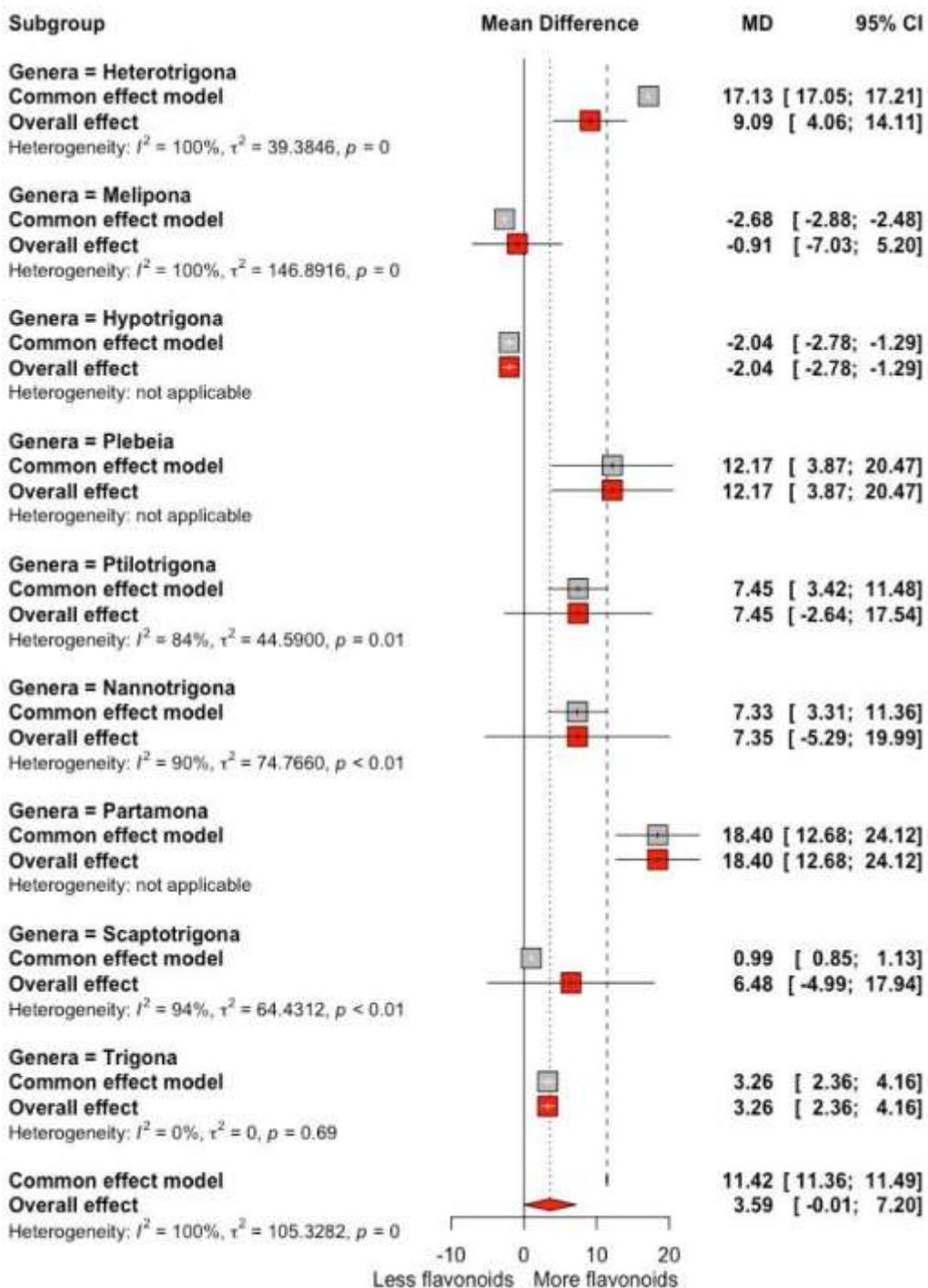


Figura 6. Diagrama de bosque del contenido de flavonoides (mg QE/100 g) para ensayos que incluyeron diferentes géneros de abejas sin aguijón. El tamaño de punto refleja la ponderación relativa del estudio en la estimación del tamaño del efecto general, donde un tamaño de punto mayor representa una mayor ponderación en la estimación del tamaño del efecto combinado, incluyendo los intervalos de confianza. El diamante representa el efecto general como la diferencia de media bruta (RMD).

La actividad antioxidante basada en el valor FRAP muestra una SMD con una diferencia significativa entre los géneros de abejas sin aguijón (Figura 7). El género *Heterotrigona* mostró una SMD de 3,55 (IC del 95 %: +1,93, +5,17), lo que sugiere un aumento significativo en la actividad antioxidante. El efecto general fue de 7.38 (IC del 95 %: +2.51, +12.25), lo que también indica un gran aumento en la actividad antioxidante ($I^2 = 67 \%$.). El género *Hypotrigona* mostró un alto efecto con una SMD de 14.53 (IC del 95 %: +9.12, +19.94), lo que sugiere un aumento en la actividad antioxidante en esta especie de abeja. La heterogeneidad de los estudios fue alta, lo que muestra que los resultados variaron entre los estudios.

El presente estudio describe las diferencias en el contenido fenólico entre la miel de *A. mellifera* y la de abeja sin aguijón. Se informa el contenido fenólico y flavonoides, ya que se consideran los principales compuestos fenólicos presentes en la miel (Kek et al., 2014; da Silva et al., 2016). Estos compuestos importantes en los productos apícolas debido a su asociación con actividades biológicas como el efecto antiinflamatorio, antimicrobiano y antioxidante, como se ha demostrado en ensayos *in vitro* (Ge et al., 2020; Tuksitha et al., 2018; Mahmood et al., 2020).

Los análisis de metarregresión mostraron que el contenido fenólico y flavonoides podría variar según el país, la fuente floral, la latitud y el tipo de abeja (*A. mellifera* y abejas sin aguijón). En este sentido, el tipo de abeja influye en la producción de miel debido a las diferentes características morfológicas y fisiológicas entre las abejas que podrían influir en las características químicas de la miel. Por ejemplo, las abejas sin aguijón son más pequeñas que las abejas *A. mellifera*, lo que les permite polinizar flores de tamaño pequeño y les da acceso a diferentes fuentes de polen y néctar (Abd et al., 2017; Mokaya et al., 2022). *A. mellifera* tiene preferencias de forrajeo por tonos y saturaciones específicos. Por el contrario, las abejas sin aguijón muestran poca preferencia por el tono o la saturación del color (Koethe et al., 2020). Las elecciones de forrajeo están influenciadas por las abejas recolectoras que regresan al nido, transmitiendo información olfativa y gustativa sobre la fuente de alimento utilizada a las compañeras de nido (Farina et al., 2005). Además, las abejas sin aguijón tienden a realizar vuelos más cortos y prefieren plantas con flores bajas para recolectar néctar (Moreira et al., 2023). Por lo tanto, las preferencias de forrajeo podrían estar relacionadas con las especies incluidas en este análisis. Asimismo, las condiciones de almacenamiento de la miel en la colmena

podrían influir en su composición; por ejemplo, las abejas sin aguijón construyen recipientes con cerumen para almacenar la miel (Wille, 1983; Khongkwanmueang et al., 2020).

El cerumen se elabora a partir de las secreciones de las glándulas ceríferas abdominales de las abejas, mezcladas con secreciones salivales y resinas vegetales recolectadas por las recolectoras (Layek et al., 2023). De manera similar, las abejas melíferas utilizan la cera producida por sus glándulas abdominales para construir el panal que utilizan para almacenar la miel (Winston, 1991). En ambos casos, el néctar recolectado por las recolectoras se mezcla con las secreciones salivales de las abejas en el momento en que se produce la trofalaxis, un proceso que también es útil para reducir el contenido de agua del néctar (Layek et al., 2023). Durante la manipulación del néctar para producir miel, el producto se expone al polen recolectado por las recolectoras; de hecho, los granos de polen se utilizan para determinar el origen floral de la miel (melisopalinología) (Herrero et al., 2002). Además, las abejas sin aguijón y las abejas melíferas recolectan resinas para producir propóleos, que en ambos casos se utilizan para sellar y desinfectar la colmena (Layek et al., 2023; Borba et al., 2015). Por lo tanto, los compuestos fitoquímicos presentes en el propóleo y el polen podrían influir en la composición química de la miel. De acuerdo con Wakhungu et al. (2022), las abejas *Hypotrigona* proporcionan buenos servicios de polinización en un radio de hasta 250 m y pueden recolectar polen de diversas fuentes florales, lo que podría aumentar la variabilidad de los compuestos fenólicos en la miel colectada por esta abeja. Alvarez-Suarez et al. (2018) realizaron un estudio comparando 16 mieles de dos especies diferentes de abejas (*A. mellifera* y *Melipona beecheii*); las muestras de miel pertenecían a municipios de Cuba, seleccionados con base en su potencial melífero y de polinización, así como su proximidad geográfica.

A partir de los mapas florales desarrollados por el Centro Nacional de Investigaciones Apícolas de Cuba, que aseguran la similitud de las plantas que sirven como fuentes de polen y néctar para las abejas, los resultados mostraron un contenido significativamente mayor de compuestos fenólicos y flavonoides en la miel de *Melipona beecheii* (abeja sin aguijón) en comparación con *A. mellifera*. En realidad, los compuestos fenólicos se han utilizado como indicadores químicos para determinar diferentes orígenes botánicos y geográficos de la miel (Cavaza et al., 2013; Das et al., 2015) y pueden influir en las

propiedades organolépticas (color, sabor o aroma) de la miel (Makawi et al., 2009). Algunos estudios han reportado altos niveles de compuestos fenólicos en la miel de abeja sin aguijón, como ácido p-cumárico, kaempferol, quercetina, ácido elágico, ácido ferúlico, transcinámico, catequina, rutina, crisina y hesperidina (Pimentel et al., 2022; Sousa et al., 2016). Por lo tanto, es importante mencionar que la variación en el contenido fenólico y flavonoides en la miel también depende de varios factores como la fuente botánica del néctar, la temporada, las condiciones de almacenamiento, el área geográfica, las condiciones ambientales, el manejo apícola, el área de alimentación y la especie de abeja (Kek et al., 2014; Moreira et al., 2023; Biluca et al., 2016). Sin embargo, se deben investigar más a fondo las preferencias de las abejas melíferas y las abejas sin aguijón por las fuentes florales y las resinas, así como la influencia de otros productos de la colmena como el propóleo y el polen en la composición química de la miel.

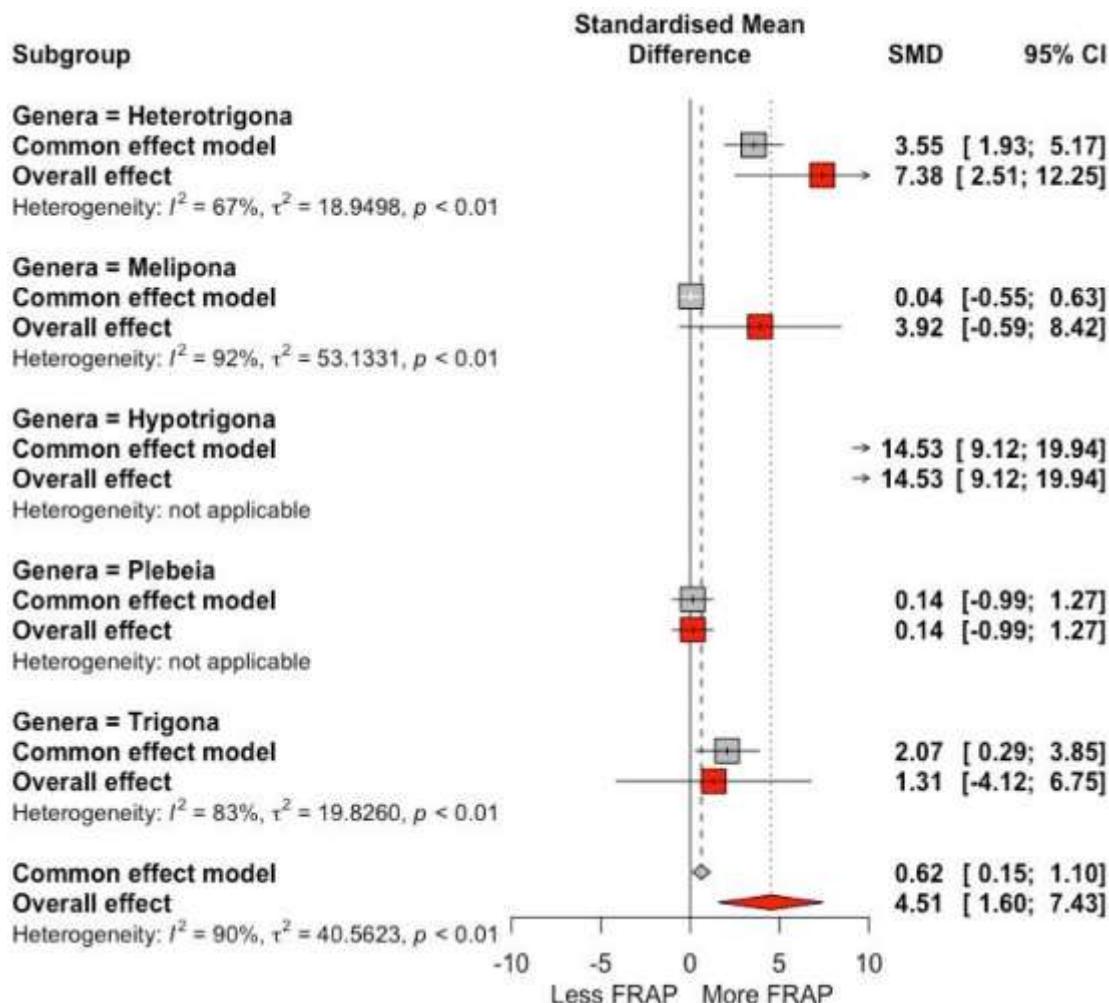


Figura 7. Actividad antioxidante del diagrama de bosque con FRAP ($\mu\text{mol Fe (II)}/100 \text{ g}$) para ensayos que incluyeron diferentes géneros de abejas sin aguijón. El tamaño de punto refleja la

ponderación relativa del estudio con respecto a la estimación del tamaño del efecto general, donde un tamaño de punto mayor representa una mayor ponderación y el tamaño del efecto combinado estimado, incluyendo los intervalos de confianza. El rombo representa el efecto general como la diferencia de media bruta (RMD).

La actividad antioxidante se analizó según el origen floral de la miel, dividida en miel monofloral y polifloral (Figura 8). Los resultados indicaron una SMD de 2,19 (IC del 95 %: +1,46, +2,92), con un efecto general superior de 6,62 (IC del 95 %: +2,34, +10,91), lo que muestra un aumento estadísticamente significativo de la actividad antioxidante en la miel polifloral ($I^2 > 90\%$).

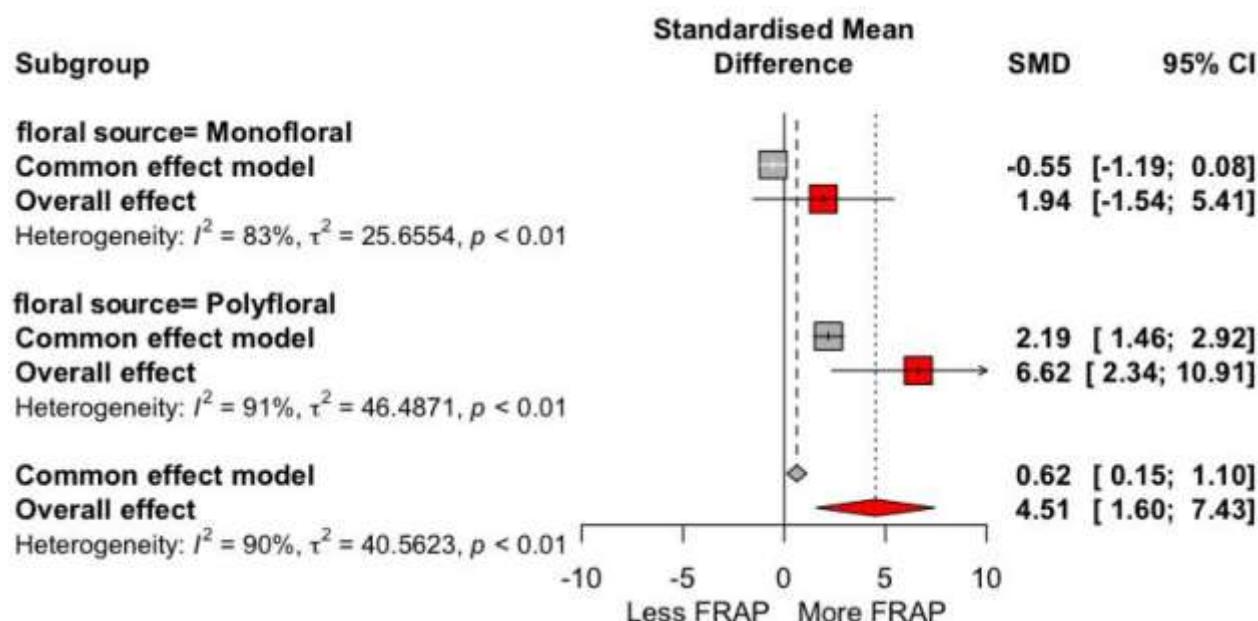


Figura 8. Diagrama de bosque de la actividad antioxidante con ensayos de origen floral FRAP ($\mu\text{mol Fe (II)}/100 \text{ g}$), divididos en origen monofloral y polifloral. El tamaño de punto refleja la ponderación relativa del estudio en la estimación del tamaño del efecto general, donde un tamaño de punto mayor representa una mayor ponderación en la estimación del tamaño del efecto combinado, incluyendo los intervalos de confianza. El rombo representa el efecto general como la diferencia media bruta (RMD).

Esta revisión sistemática compara la actividad antioxidante de la miel de *A. mellifera* y la miel sin aguijón utilizando las técnicas DPPH y FRAP. Los resultados indican una mayor actividad antioxidante en la miel de abejas sin aguijón en comparación con la miel de *A. mellifera*, como lo evidencian los valores de FRAP. Varios estudios han vinculado los ácidos fenólicos y flavonoides en la miel con su actividad antioxidante (Shamsudin et al.,

2022; Tuiz-Ruiz et al., 2017; Tuksitha et al., 2018). Esta actividad está fuertemente influenciada por la estructura molecular de los compuestos fenólicos (Zehiroglu et al., 2019), especialmente el número y la disposición de los grupos hidroxilo y la posición de los anillos fenólicos, que son cruciales para su actividad antioxidante (Zehiroglu et al., 2019; Martinello & Mutinelli, 2021). La actividad antioxidante consiste en el mecanismo por el cual los antioxidantes eliminan o reducen la formación de radicales libres (especies reactivas de oxígeno—ROS) en la célula (da Silva et al., 2016). Los antioxidantes protegen a las células del daño oxidativo causado por los radicales libres y contribuyen a la prevención de ciertas enfermedades (Martinello & Mutinelli, 2021), incluyendo enfermedades cardiovasculares, envejecimiento, enfermedades cardíacas, cáncer e inflamación (Zehiroglu et al., 2019). La actividad antioxidante en la miel puede estimarse utilizando diferentes técnicas, como los ensayos DPPH y FRAP. El DPPH se utiliza en un ensayo de eliminación de radicales; basado en la transferencia de electrones, el antioxidante dona un electrón al radical DPPH, neutralizándolo y convirtiéndolo a la forma reducida, mientras que el antioxidante se oxida (Jan et al., 2022). El radical DPPH produce una solución violeta intensa. Cuando una solución de DPPH se mezcla con un compuesto de prueba que puede donar un átomo de hidrógeno, esto cambia el color del compuesto a incoloro o amarillo claro a medida que se eliminan los radicales libres (Kedare et al., 2011). El ensayo FRAP mide la capacidad del antioxidante para reducir los iones férricos (Fe^{3+}) a iones ferrosos (Fe^{2+}) (Shamsudin et al., 2022). Un ensayo antioxidante evalúa la capacidad de estos compuestos fenólicos y flavonoides para donar un electrón de un grupo hidroxilo a un electrón desapareado de radicales libres y luego ocurre la actividad antioxidante (Ge et al., 2020; Chua et al., 2013). La reacción de neutralización de radicales depende de muchos factores, entre ellos la concentración de iones de hidrógeno en el sistema de medición (Dawidowicz et al., 2012).

Las diferencias en la actividad antioxidante encontradas en la revisión sistemática y metaanálisis actuales entre *A. mellifera* y miel sin aguijón pueden estar relacionadas con la presencia de componentes como vitamina C, vitamina E y carotenoides, que pueden contribuir a la mayor actividad antioxidante de la miel sin aguijón (Jiménez et al., 2016; Escuredo et al., 2013). Juntos, estos componentes pueden aumentar la actividad antioxidante y estimular biomoléculas (por ejemplo, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos) en las células para producir especies reactivas de oxígeno, lo que

resulta en una alta respuesta antioxidante (Pimentel et al., 2022). Por lo tanto, la actividad antioxidante resulta de la actividad combinada de varios compuestos, no solo compuestos fenólicos y flavonoides (Tuksitha et al., 2018). En consecuencia, Shamsudin et al. (2022) encontraron que el contenido fenólico, los flavonoides y la actividad antioxidante fueron mayores en la miel sin aguijón que en la miel de *A. mellifera*. Además, nuestros resultados mostraron que el género de abejas *Hypotrigona* produjo miel con mayor actividad antioxidante en comparación con las otras especies de abejas sin aguijón ($p<0.05$).

7.2.2. Composición fisicoquímica

El metaanálisis mostró diferencias significativas en los parámetros fisicoquímicos (Tabla 3). La humedad (%) fue mayor en la miel de abeja sin aguijón en +8.02% ($p= 0.0001$; IC 95%: +5.93, +10.11%), con el SMD más alto (+10.09; $p=0.0001$) en comparación con la miel de *A. mellifera*. Adicionalmente, la miel de abeja sin aguijón mostró una acidez libre más alta comparada con la miel de *A. mellifera* en +34.76 meq/kg $p=0.01$; IC 95%: +7.17; +62.34). La intensidad del color fue mayor en la miel de abeja sin aguijón en contraste con la miel de *A. mellifera* (+10.24; IC 95%: +10.22, +30.71), con evidencia de heterogeneidad significativa ($I^2=95.1\%$). Por el contrario, la miel de abeja sin aguijón mostró un menor contenido de HMF (-11,25 meq/100 g; $p= 0.001$; IC 95%: -15,88, -6,62) en comparación con la miel de *A. mellifera*.

7.2.3. Análisis de metarregresión

Se realizó un análisis de metarregresión para explicar la heterogeneidad significativa entre los estudios ($I^2 > 90\%$) para las variables analizadas, los parámetros fisicoquímicos, el contenido fenólico, los flavonoides y la actividad antioxidante. Se identificaron a priori cuatro covariables para explicar la variabilidad: (1) especie de abeja sin aguijón; (2) fuente floral para la producción de miel; (3) país y (4) latitud. Las pendientes de la metarregresión y la significancia estadística de las covariables, para niveles de heterogeneidad de $I^2 > 25\%$, se muestran en la Tabla 3. Varrios géneros de abejas, la fuente floral y el país influyeron en el contenido fenólico. Los resultados de la metarregresión mostraron que los géneros *Melipona* podrían producir miel con menor contenido fenólico (-26,01), ($p< 0,05$). En cuanto al país, Cuba ($\beta= +69.58$; $p< 0.001$) y Perú ($\beta= +82.04$; $p< 0.001$) se asociaron con un aumento significativo del contenido fenólico de la miel. La latitud

también influyó, como se observó en Nigeria ($\beta=-1.19$; $p< 0.01$), que mostró una disminución del contenido fenólico.

Tabla 3. Pendientes de metaregresión y significancia de covariables para resultados con una heterogeneidad moderada o alta ($P> 25\%$).

Variable	Covariables (β)			R^2	P
	Géneros	Fuente floral	País		
Fenoles	<i>Melipona</i> -26.01 *	Polifloral -45.60 **	Cuba +69.58 ***	-1.19 **	87.85 59.41
	<i>Nannotrigona</i> -29.43 *		Nigeria +63.61 ***		
	<i>Partamona</i> -27.41 *		Perú +82.04 ***		
Flavonoides			Cuba +18.07 ***	-0,46 **	9.34 97.76
			Nigeria +19.87 ***		
			Perú +15.31 ***		
FRAP	<i>Hypotrigona</i> +12.11 *	Polifloral +13.60 ***	Cuba -10.03 ***		83.78 74.66
	<i>Melipona</i> -8.59 **		Nigeria -17.47 ***		
	<i>Plebeia</i> -6.98 *				
	<i>Trigona</i> -14.42 ***				
Humedad	<i>Trigona</i> -14.44 *	Polifloral +14.65 *	Cuba -15.02 **		53.86 91.55
			Nigeria -16.87 **		
			Perú -9.89 *		
HMF	<i>Hipotrigona</i> +26.55 ***	Polifloral -3.91 ***	Cuba +2.35 *		100.0 0.0
	<i>Melipona</i> +19.43 ***				
	<i>Plebeia</i> +19.82 ***				
Acidez libre	<i>Hypotrigona</i> +27.47 ***	Polifloral -2.53 *	Brasil +6.14 ***	-0.31 *	96.58 70.06
	<i>Melipona</i> -7.76 ***		Cuba +2.95 *		
	<i>Scaptotrigona</i> -5.09 *		Nigeria -10.85 ***		
	<i>Trigona</i> -45.95 **				
Color	<i>Hipotrigona</i> +24.48 **		Brasil -69.59 *	-2.39 *	99.93 11.69
	<i>Melipona</i> +23.64 **		Nigeria -30.80 *		
	<i>Plebeia</i> +28.13 ***				

R^2 = grado de heterogeneidad considerado para el modelo mixto. Códigos de significancia: *** < 0.001; ** < 0.01; * < 0.05

El contenido de flavonoides fue significativamente mayor en la miel de abeja sin aguijón de Cuba ($\beta= +18.07$; $p< 0.001$), Nigeria ($\beta= +19.87$; $p< 0.001$) y Perú ($\beta= +15.31$; $p< 0.001$) en comparación con la miel de Malasia, Brasil y Portugal. En este sentido, el país influyó significativamente en el contenido fenólico de la miel.

Los resultados mostraron una relación positiva entre el género *Hypotrigona* y la actividad antioxidante ($\beta= +12.11$; $p< 0.05$). La fuente polifloral mostró una asociación positiva con la alta actividad antioxidante de la miel ($\beta= +13.60$; $p< 0.001$). La miel de la fuente

polifloral tuvo un mayor porcentaje de humedad ($\beta= +14.65$; $p< 0.05$) en comparación con la miel de la fuente monofloral. Además, la humedad fue significativamente menor en la miel de Cuba ($\beta= -15.02$; $p< 0.01$), Nigeria ($\beta= -16.87$; $p< 0.01$) y Perú ($\beta= -9.89$; $p< 0.05$) en comparación con el resto de las localidades estudiadas. Además, el contenido de hidroximetilfurfural en la miel de abejas sin aguijón fue menor para la miel con un origen botánico polifloral en comparación con la miel de fuentes monoflorales ($\beta= -3.91$; $p< 0.001$). Además, la acidez libre fue menor en la miel de las especies *Melipona* ($\beta= -7.76$; $p< 0.001$), *Scaptotrigona* ($\beta= -5.09$; $p< 0.05$) y *Trigona* ($\beta= -45.95$; $p< 0.01$) en comparación con las abejas *Heterotrigona*, *Hypotrigona*, *Plebeia*, *Ptilotrigona*, *Nannotrigona* y *Partamona*. La miel que mostró la acidez libre más alta se produjo en Brasil ($\beta= +6.14$; $p< 0.001$) y Cuba ($\beta= +2.95$; $p< 0.05$), y la miel de Nigeria tuvo los valores más bajos de acidez libre ($\beta= -10.85$; $p< 0.001$) en comparación con el resto de los países. La intensidad del color fue significativamente menor en la miel de Brasil ($\beta= -69.59$; $p< 0.05$) y Nigeria ($\beta= -30.80$; $p< 0.05$). Por último, nuestros resultados revelaron que el contenido fenólico ($\beta= -1.19$; $p< 0.01$), flavonoides ($\beta= -0.46$; $p< 0.01$), acidez libre ($\beta= -0.31$; $p< 0.05$) y la intensidad del color ($\beta= -2.39$ $p< 0.05$) de la miel se correlacionaron negativamente con la latitud.

Los resultados revelaron diferencias significativas en los parámetros fisicoquímicos entre la miel sin aguijón y la miel de *A. mellifera*, destacando el alto porcentaje de humedad y acidez libre en contraste con el menor contenido de HMF y actividad de diastasa en la miel sin aguijón. En este sentido, las propiedades fisicoquímicas como el color, la acidez libre, la humedad y el HMF de la miel son algunos de los parámetros utilizados para la autenticación, la medición de la calidad y la detección de cualquier adulteración en el producto (Kek et al., 2017). Los criterios de calidad fisicoquímica de la miel de la abeja *A. mellifera* están bien especificados, establecidos por la Comisión del Codex Alimentarius (2001) (Won et al., 2019), pero estos no pueden aplicarse para la miel de abeja sin aguijón. Se ha demostrado que la humedad, la acidez libre, la actividad de diastasa y el contenido de HMF varían entre la miel de *A. mellifera* y la miel de abeja sin aguijón (Jimenez et al., 2016). La diferencia fisicoquímica encontrada en el presente estudio podría estar relacionada con varios factores como el origen botánico, la zona geográfica, el clima, el método de cosecha, los géneros y especies de abejas (Mokaya et al., 2022). Una implicación del presente estudio es la posibilidad de contribuir a la determinación de

parámetros de calidad que son importantes de conocer, para establecer estándares de calidad para la miel de abejas sin aguijón y para prevenir su adulteración (Silva et al., 2021).

7.2.4. Humedad

Con base en los estudios disponibles, se encontró que la miel sin aguijón presentó altos niveles de humedad (>20%) para ser comparada con la miel de *A. mellifera*; la relevancia de este hallazgo radica en que la humedad es un parámetro de calidad en los estándares establecidos de la miel. Además, la humedad afecta la viscosidad, el sabor y la cristalización, y se considera un indicador útil para mejorar el almacenamiento y la conservación (Rozman et al., 2022; Silva et al., 2021). El alto contenido de humedad en la miel sin aguijón no es sorprendente, ya que ha sido ampliamente reportado para este tipo de miel (Lira et al., 2014). Este mayor contenido de humedad de la miel sin aguijón podría estar relacionado con el hecho de que las abejas sin aguijón recolectan el néctar de las flores de plantas de bajo crecimiento, que tienden a producir néctar rico en agua (Bertsch, 1983; Ávila et al., 2020). De acuerdo a Jiménez et al. (2016), el contenido de humedad de la miel de abejas sin aguijón varía según el área geográfica y la vegetación predominante. En áreas tropicales, la vegetación polifloral está influenciada por las altas precipitaciones anuales y la alta humedad, lo que puede aumentar el contenido de agua de la miel, mientras que en una selva tropical, la miel se caracteriza por un bajo contenido de agua (Rozman et al., 2022; Mokaya et al., 2022). Las abejas sin aguijón almacenan la miel en recipientes hechos de cerumen, mientras que *A. mellifera* almacena la miel en un panal hexagonal construido con cera de abejas, que es un material complejo con más de 300 sustancias identificadas (Kek et al., 2017). Durante el almacenamiento de la miel, las abejas sin aguijón y las abejas melíferas utilizan la trofalaxis para reducir el contenido de agua del néctar recolectado para producir miel, pero el contenido de humedad de la miel de abejas sin aguijón suele ser más alto (~31%) (Roubik, 1983).

El alto contenido de humedad influye en las características de la miel, ya que permite que los microorganismos proliferen durante el almacenamiento, especialmente las levaduras, que podrían causar la fermentación de la miel (Nordin et al., 2018; Mokaya et al., 2022). En contraste, la miel producida por *A. mellifera* tiene un menor contenido de agua (<20%), lo que impide que ocurra el proceso de fermentación (Winston, 1991). El proceso de

fermentación podría considerarse como contribuyente al riesgo de deterioro en la miel de *A. mellifera*, pero en la miel de abeja sin aguijón, no parece afectar la calidad del producto (Dos Santos et al., 2021). El Codex Alimentarius (CA) establece el 20% como el límite máximo de humedad en la miel de *Apis mellifera* (CA, 2021), por lo que estos estándares actuales no se pueden aplicar a la miel de abeja sin aguijón debido al contenido natural de agua en cada producto; por lo tanto, es necesario establecer estándares específicos para la miel de abeja sin aguijón.

7.2.5. Acidez libre

Los resultados mostraron que la acidez libre fue mayor en la miel sin aguijón comparada con la cantidad de miel de *A. mellifera*. La acidez libre se considera uno de los parámetros más importantes para evaluar la frescura de la miel (Silva et al., 2021). La acidez libre se refiere a los ácidos naturales libres presentes en la miel, que contribuyen al sabor de la miel, la estabilidad contra microorganismos y las actividades antibacterianas y antioxidantes (Cavia et al., 2007). La elevada acidez puede contribuir a prolongar la vida útil de la miel, ya que genera un entorno desfavorable para el crecimiento de microorganismos no deseables (Mokaya et al., 2022), como *Escherichia coli* y *Streptococcus aureus* (Chan-Rodríguez et al., 2012; Ng et al., 2020). Además, las diferencias en la acidez libre encontradas entre las mieles podrían estar relacionadas con la fuente floral, la temporada de cosecha, el proceso de almacenamiento y el área geográfica (Alves et al., 2013; Habib et al., 2014). El límite máximo de acidez libre según el Codex Alimentarius (2001) es de 50 meq/kg para la miel de *A. mellifera*. La miel sin aguijón presenta niveles más altos y, por lo tanto, no cumple con estas regulaciones (Biluca et al., 2016). Como se mencionó anteriormente, la miel sin aguijón no está incluida en las normas internacionales para la miel. Dado el potencial de la miel sin aguijón para integrarse en los mercados regionales e internacionales, es imperativo establecer parámetros para este producto que garanticen su consumo seguro, calidad y comercialización.

7.2.6. Hidroximetilfurfural (HMF)

Nuestro análisis mostró concentraciones más bajas de HMF en la miel de abejas sin aguijón con respecto a la miel de *A. mellifera*. El HMF es un parámetro importante para la frescura, el sobrecalentamiento y la calidad de la miel (Yaákob et al., 2019; Godocikova

et al., 2020). Las diferencias encontradas en el contenido de HMF se pueden explicar por varios factores como el calor, el tiempo de almacenamiento prolongado, el contenido de azúcares simples, el contenido de ácidos, minerales, fuentes florales y las condiciones ambientales (Jiménez et al., 2016; Sousa et al., 2016). El hidroximetilfurfural es un compuesto orgánico heterocíclico de seis carbonos que contiene grupos funcionales aldehído y alcohol (hidroximetilo), formados por la degradación de azúcares (Ávila et al., 2018). En relación con nuestros resultados, el HMF se puede formar por la reacción de Maillard; por lo tanto, debido a la alta actividad de agua (Aw) y acidez en la miel sin aguijón, la reacción de Maillard podría ser lenta y la formación de HMF podría inhibirse, lo que explica parcialmente el contenido reducido de HMF en la miel sin aguijón Biluca et al., 2014). Finalmente, además de la importancia del contenido de HMF para evaluar la calidad de la miel, se ha descubierto que el HMF es tóxico para ratas y ratones; no se pueden excluir los posibles riesgos para la salud humana asociados con altas concentraciones (Zirbes et al., 2013). En este sentido, los niveles más bajos que se encuentran en la miel sin aguijón son una ventaja en comparación con la miel de *A. mellifera*.

7.2.7. Color

El alto contenido de ácidos fenólicos y flavonoides puede explicar la mayor intensidad de color encontrada en la miel sin aguijón comparados con los resultados de la miel de *A. mellifera*. La importancia del color de la miel radica en que indica la presencia de pigmentos, como flavonoides y carotenoides (Otmani et al., 2021); también, el color es una de las principales características que los consumidores tienen en cuenta al comprar miel (Ramly et al., 2021). El color de la miel varía de amarillo claro a marrón oscuro; la miel de color claro suele ser baja en compuestos minerales y fenólicos, mientras que la miel de color oscuro suele ser alta en compuestos minerales y fenólicos (Biluca et al., 2016), y las diferencias en el color de la miel están asociadas con el origen botánico, el contenido fenólico, las reacciones bioquímicas durante la maduración de la miel y la exposición a altas temperaturas o luz (Kek et al., 2014).

7.3. Segunda etapa: caracterización fisicoquímica

7.3.1. Humedad

La humedad es una de las características fisicoquímicas más importantes relacionadas con la estabilidad, la viscosidad, la madurez, el peso específico, la cristalización, la vida útil y el sabor de la miel (Gela et al., 2021). Nuestros resultados están en consonancia con estudios anteriores que han demostrado que la miel de abejas sin aguijón tiene un mayor contenido de humedad en comparación con la miel producida por *A. mellifera* (Sousa et al., 2013; Chuttong et al., 2016; Jiménez et al., 2016), que es $\leq 20\%$ según la Comisión del Codex Alimentarius, (CA, 2001). Además, hubo diferencias estadísticas en el porcentaje de humedad presente ($p<0.05$; Tabla 4). El contenido medio de humedad de todas las muestras de miel de *S. mexicana* fue de 28.13%. La variación en el contenido de humedad se puede atribuir a diversos factores, como la vegetación, las condiciones climáticas, el suelo, la cosecha, el procesamiento, las especies de abejas y el origen geográfico (Jiménez et al., 2016; Silvano et al., 2014). Las muestras de miel 20P, 21P y 24P de la Palmilla presentaron el mayor contenido de humedad. La baja altitud de esta región, con su elevada temperatura y alta humedad relativa, podría explicar potencialmente este hecho. Mohammed (2022) afirmó que elevadas temperaturas y una humedad ambiental más elevada podrían aumentar el porcentaje de humedad de las muestras de miel, mientras que las temperaturas más bajas probablemente darían lugar a muestras de miel con porcentajes de humedad más bajos. En las zonas tropicales, la vegetación polifloral se ve influida por las elevadas precipitaciones anuales y la alta humedad; por lo tanto, aumenta el contenido de agua de la miel (Mokaya et al., 2020; Rozman et al., 2022). Los altos niveles de humedad promueven la fermentación, a menudo causada por la acción de levaduras osmotolerantes, lo que resulta en la formación de etanol y dióxido de carbono (Alves et al., 2013). Como resultado, la fermentación puede producir etanol, que puede degradarse en ácido acético y agua, dando a la miel un sabor agrio o desagradable y una textura líquida con pequeñas burbujas. (Moo-Huchin et al., 2015). En este sentido, las condiciones ambientales, como la temperatura y la elevada humedad, pueden influir en la floración de la planta para que produzca néctar con una elevada humedad pero un bajo contenido de azúcar (Agus et

al., 2021). Por lo tanto, estos resultados concuerdan con estudios previos que reportaron un contenido de humedad >20% (Jiménez et al., 2016; Marcolin et al. 2021).

7.3.2. Cenizas

El contenido en cenizas de las muestras de miel de *S. mexicana* osciló entre 0,12 y 0,85 g /100 g, como se muestra en la Tabla 4. Se observaron diferencias estadísticas entre las mieles de distintas localidades ($p<0.05$). La determinación de cenizas representa el contenido mineral de la miel y está asociada a la zona geográfica y al origen botánico del néctar recolectado por las abejas melíferas (Marcolin et al. 2021). Se considera que la miel de color claro tiene un contenido de cenizas más bajo que las mieles de color oscuro (Souza et al., 2006). Algunos estudios reportaron que los minerales presentados en la miel son importantes para la nutrición humana (Madejczyk & Baralkiewicz, 2008; Alqarni et al., 2012; da Silva et al., 2016). Los resultados de este estudio son similares a los de la miel de *Heterotrigona itama* de Malasia, que oscilan entre 0.15 y 0.90 g/100 g (Lim et al., 2006).

Tabla 4. Comparación media de los parámetros fisicoquímicos de las muestras de *Scaptotrigona mexicana* recolectadas en diferentes localidades del estado de Puebla, México, en comparación con los estándares de miel de *Apis mellifera*, incluyendo cenizas, actividad diastásica, hidroximetilfurfural (HMF), azúcares reductores y acidez libre (n=24).

Muestra	Humedad (%)	Cenizas	Actividad de diastasa (Unidades Göthe)	HMF (mg/kg)	Azúcares reductores	Acidez libre (meq/ kg)
1 P	27.07 ± 0.05 ^{abc}	0.54 ± 0.02 ^{abc}	1.66 ± 0.01 ^{ab}	1.61 ± 0.14 ^{ab}	50.42 ± 1.91 ^a	13.67 ± 0.58 ^{abc}
2 P	24.76 ± 0.08 ^a	0.36 ± 0.01 ^{abc}	28.33 ± 2.89 ^a	1.58 ± 0.01 ^{ab}	58.33 ± 0.72 ^{abc}	3.67 ± 0.58 ^c
3 P	26.4 ± 0.08 ^{abc}	0.33 ± 0.01 ^{abc}	1.42 ± 0.01 ^{ab}	1.57 ± 0.01 ^{ab}	55 ± 5.73 ^{abc}	20.33 ± 1.53 ^{abc}
4 H	27.29 ± 0.02 ^{abc}	0.85 ± 0.05 ^b	1.02 ± 0.02 ^{ab}	1.95 ± 0.5 ^{ab}	68.75 ± 1.25 ^c	34 ± 1 ^{abc}
5 H	25.2 ± 0.04 ^{ac}	0.55 ± 0.05 ^{abc}	6.44 ± 0.38 ^{ab}	1.53 ± 0.06 ^{ab}	62.08 ± 0.72 ^{abc}	38.5 ± 0.5 ^{abc}
6 A	28.28 ± 0.07 ^{abc}	0.4 ± 0.01 ^{abc}	1.07 ± 0.02 ^{ab}	1.57 ± 0.01 ^{ab}	62.92 ± 0.72 ^{abc}	44 ± 1 ^{abc}
7 L	30.55 ± 0.17 ^{bc}	0.55 ± 0.05 ^{abc}	3.40 ± 0.11 ^{ab}	1.61 ± 0.14 ^{ab}	58.58 ± 0.29 ^{abc}	67.67 ± 0.58 ^{abc}
8 H	28.57 ± 0.05 ^{abc}	0.46 ± 0.05 ^{abc}	1.61 ± 0.05 ^{ab}	1.78 ± 0.05 ^b	58.29 ± 0.59 ^{abc}	44.33 ± 1.53 ^{abc}
9 T	28.59 ± 0.1 ^{abc}	0.38 ± 0.03 ^{abc}	1.39 ± 0.04 ^{ab}	1.64 ± 0.01 ^{ab}	63.75 ± 1.25 ^{abc}	50.33 ± 0.58 ^{abc}
10 A	29.05 ± 0.06 ^{abc}	0.19 ± 0.01 ^{abc}	1.01 ± 0.01 ^{ab}	1.72 + 0.04 ^{ab}	58.33 ± 0.72 ^{abc}	66.67 ± 0.58 ^{abc}
11 T	28.46 ± 0.08 ^{abc}	0.6 ± 0.1 ^{abc}	1.54 ± 0.04 ^{ab}	0.05 + 0.01 ^a	67.08 ± 1.91 ^{bc}	36.67 ± 1.53 ^{abc}
12 H	28.39 ± 0.04 ^{abc}	0.55 ± 0.05 ^{abc}	7.22 ± 0.48 ^{ab}	1.57 ± 0.06 ^{ab}	51.67 ± 0.72 ^{ab}	47.33 ± 0.58 ^{abc}
13 A	26.04 ± 0.11 ^{abc}	0.65 ± 0.05 ^{abc}	1.08 ± 0.02 ^{ab}	1.64 ± 0.04 ^{ab}	53.58 ± 3.61 ^{abc}	29.83 ± 0.76 ^{abc}

14 A	27.61 \pm 0.09 ^{abc}	0.29 \pm 0.01 ^{abc}	1.05 \pm 0.02 ^{ab}	1.62 \pm 0.01 ^{ab}	63.33 \pm 1.44 ^{abc}	55.67 \pm 1.33 ^{abc}
15 C	28.82 \pm 0.03 ^{abc}	0.16 \pm 0.01 ^{abc}	3.22 \pm 0.1 ^{ab}	1.68 \pm 0.01 ^{ab}	57.92 \pm 1.44 ^{abc}	76 \pm 1 ^a
16 C	27.33 \pm 0.02 ^{abc}	0.37 \pm 0.05 ^{abc}	1.22 \pm 0.01 ^{ab}	1.58 \pm 0.01 ^{ab}	59.58 \pm 1.44 ^{abc}	33.67 \pm 0.58 ^{abc}
17 A	27.11 \pm 0.07 ^{abc}	0.42 \pm 0.01 ^{abc}	1.62 \pm 0.04 ^{ab}	1.56 \pm 0.01 ^{ab}	60.83 \pm 1.44 ^{abc}	49.33 \pm 1.53 ^{abc}
18 R	29.34 \pm 0.01 ^{abc}	0.5 \pm 0.01 ^{abc}	9.05 \pm 0.82 ^a	1.75 \pm 0.05 ^{ab}	57.50 \pm 1.25 ^{abc}	69 \pm 2.65 ^{ab}
19 R	29.54 \pm 0.19 ^{abc}	0.12 \pm 0.01 ^c	ND	1.69 \pm 0.01 ^{ab}	57.92 \pm 0.72 ^{abc}	49.33 \pm 1.15 ^{abc}
20 P	28.09 \pm 0.06 ^{abc}	0.19 \pm 0.01 ^{abc}	1 \pm 0.01 ^{ab}	1.68 \pm 0.01 ^{ab}	55 \pm 3.3 ^{abc}	15 \pm 1 ^{abc}
21 P	32.64 \pm 0.87 ^b	0.32 \pm 0.01 ^{abc}	1 \pm 0.01 ^{ab}	1.62 \pm 0.01 ^{ab}	57.08 \pm 1.44 ^{abc}	9 \pm 1 ^{bc}
22 R	26.34 \pm 0.11 ^{abc}	0.19 \pm 0.01 ^{abc}	ND	1.55 \pm 0.01 ^{ab}	54.58 \pm 0.72 ^{abc}	40 \pm 1 ^{abc}
23 C	29.60 \pm 0.07 ^{abc}	0.15 \pm 0.01 ^{ac}	1.43 \pm 0.01 ^{ab}	1.77 \pm 0.08 ^{ab}	55.83 \pm 3.15 ^{abc}	48.67 \pm 1.53 ^{abc}
24 P	30.10 \pm 0.81 ^{abc}	0.17 \pm 0.01 ^{abc}	1.25 \pm 0.01 ^{ab}	1.67 \pm 0.05 ^{ab}	57.08 \pm 0.72 ^{abc}	13.67 \pm 0.58 ^{abc}
Promedio	28.13 \pm 1.75	0.39 \pm 0.19	3.25 \pm 5.74	1.58 \pm 0.35	58.60 \pm 4.64	39.85 19.74
A. <i>mellifera</i>	<20%	0.60 g/100g	> 3 Schade Units.	40-80 mg/kg	>60 g/100g	50 meq/kg
Referencia*						
Min - max	24.76-32.64	0.12 – 0.85	1 – 28.33	0.05 – 1.95	50.42 – 68.75	3.67 - 76
Curtoisis	3.58	2.7	16.5	16.8	3.03	2.21
Asimetría	0.34	0.49	3.66	-3.27	0.21	-0.08
Coeficiente de variación	6.25	48.42	176.55	21.97	7.92	49.54

*Parámetros basadas en la Norma del Codex para la Miel, 2001: NMX-F-036-981; NOM-004-SAG/GAN-2018. ND= No detectado. Como se muestra en los datos, letras diferentes (a-c) en la misma columna indican diferencias significativas entre mieles del mismo género y producidas en diferentes áreas geográficas, según lo determinado por la prueba de Dunn ($p \leq 0.05$).

7.3.3. Actividad de la diastasa

La diastasa (α -amilasa) es una enzima habitualmente presente en la miel de *A. mellifera* y se considera un parámetro vinculado a la calidad y a la frescura (Ahmed et al., 2013). La legislación vigente establece un valor mínimo de 3 hasta 8 unidades Göthe para la miel procedente de zonas tropicales Codex Alimentarius (2001). La actividad diastásica en la miel de *S. mexicana* mostró valores entre 1 y 28.33 unidades Göthe, con una media general de 3.25 ± 5.74 unidades Göthe (Tabla 2). La mayoría de los resultados de este estudio mostraron niveles más bajos en comparación con el valor mínimo establecido por

el Codex Alimentarius, y dentro de los resultados de estudios previos, por ejemplo, Biluca et al. (2016) reportaron valores de 4.34 para la miel de *S. bicinctata*. La presencia de esta enzima se atribuye a las secreciones salivales de las abejas (Alaerjani & Mohammed, 2024).

7.3.4. Hidroximetilfurfural

El hidroximetilfurfural (HMF) es un intermediario de la reacción de Maillard que se obtiene debido a la deshidratación de azúcares por el efecto de condiciones acidas o altas temperaturas (Pasias et al., 2017). Es un parámetro utilizado para establecer la calidad y frescura de la miel (Mokaya et al., 2022). Los resultados de HMF en este estudio de muestras de *S. mexicana* oscilaron entre 0.05 y 1.95 mg/kg, como se muestra en la Tabla 4. Se ha reportado que el HMF causa efectos adversos a la salud humana como daño al ADN, mutagenicidad, organotoxicidad, genotoxicidad, carcinogenicidad e inhibición enzimática (Baroyi et al., 2022). La elevada concentración de HMF es un signo de sobrecalentamiento, almacenamiento prolongado en malas condiciones o envejecimiento de la miel (Eshete, 2021). En este sentido, el menor contenido de HMF en la miel de *S. mexicana* podría ser beneficioso. Biluca et al. (2014), informaron de que la miel de abejas sin aguijón podría mostrar resistencia a la formación de HMF incluso después de la exposición a altas temperaturas, probablemente debido a su alta acidez, alta humedad y predominio de fructosa. La formación de HMF está influenciada por la fructosa en la miel; el HMF puede formarse por deshidratación de la hexosa en un ácido o por la reacción de Maillard, que se produce cuando los azúcares se condensan con aminoácidos libres (Jiménez et al., 2016). Nuestros resultados están en consonancia con estudios anteriores, que mostraron bajos niveles de HMF en la miel de abejas sin aguijón en un rango de 0.80 a 3.42 mg/kg (Fatima et al., 2018).

7.3.5. Azúcares reductores

Los azúcares reductores (AR) se refieren a la fructosa y la glucosa; estas moléculas proporcionan una fuente inmediata de energía e influyen en el sabor (Sant'ana et al., 2020; Zawawi et al., 2020). El contenido de azúcares reductores en las muestras miel de *S. mexicana* osciló entre 50.42 y 68.75, con una media de 58.60 ± 4.64 , como se muestra en la Tabla 4. Los AR son los principales carbohidratos de la miel (Nordin et al., 2018) que influyen en la higroscopacidad, la viscosidad y la granulación (Agus et al., 2021).

Nuestros resultados mostraron un menor contenido de AR comparado con el reportado por Sant'ana et al., (2020). Asimismo, nuestros resultados concuerdan con los de Silva et al. (2013), que reportaron un contenido de AR de 56.14 %. De acuerdo a Chuttong et al. (2016). La miel producida por abejas sin aguijón se caracteriza por su menor contenido de monosacáridos (glucosa y fructosa). Según un estudio de Fletcher et al., (2020) la razón del menor contenido de azúcares reductores (glucosa y fructosa) en la miel de abejas sin aguijón en comparación con la miel de *A. mellifera* podría atribuirse al predominio de la trehalosa, un disacárido e isómero de la sacarosa. El contenido de azúcares podría estar influido por el origen geográfico, las fuentes de néctar de las plantas y las condiciones ambientales (temperatura y humedad), el procesamiento de la miel tras la cosecha (por ejemplo, calentamiento, exposición a la intemperie y manipulación), el tiempo de almacenamiento y las especies de abejas (Da Silva et al. 2016; Biluca et al. 2016; Xolalpa-Aroche et al., 2024). La variabilidad en el contenido de AR entre las diferentes muestras de miel podría explicarse por las diferentes fuentes botánicas de néctar, en este caso los cultivos predominantes que podrían ser visitados por las abejas incluyen *Pimenta dioica* y *Café arábiga* y plantas nativas, como *Helicocarpus sp* y *Miconia spp* (INEGI, 2024). En este contexto, los rendimientos de néctar por flor, las proporciones de hexosas y los contenidos de sacarosa varían entre plantas y con la fecha de recolección del néctar (Clearwater et al., 2018).

7.3.6. Acidez libre, lactona y acidez total

La acidez libre es uno de los parámetros más importantes para el control de calidad de la miel, ya que contribuye a su sabor, mejora la actividad antioxidante y es eficaz contra la acción de los microorganismos (Moo-Huchin et al., 2015). En las muestras analizadas en este estudio, los valores de acidez libre oscilaron entre 3,67 y 76 meq/ kg, con una media global de $39,85 \pm 19,74$ meq/ kg (Tabla 4). Estos elevados valores de acidez libre no cumplen la norma del Codex Alimentarius (CA, 2001), que indica un máximo de 50 meq/kg) para la miel de *A. mellifera*. Los resultados en este estudio son similares a los reportados por López-Garay et al., (2023), quienes analizaron miel de *S. mexicana* de Veracruz, México y los valores obtenidos fueron 35.33 ± 0.58 meq/ kg. La acidez libre puede aumentar con el tiempo, debido al proceso de fermentación provocado por las levaduras que pueden estar presentes en este tipo de miel, los azúcares y el alcohol se

transforman en ácidos (Cavia et al., 2007). En presencia de oxígeno, el alcohol puede transformarse en ácido acético y agua; como resultado, la miel que ha fermentado puede tener un sabor agrio (Escuredo et al., 2013 Zawawi et al., 2020). Los ácidos orgánicos, en particular el ácido glucónico, que está en equilibrio con la lactona, contribuyen a la acidez libre (Moo-Huchin et al., 2015). La variación en el contenido de ácido total en las diferentes muestras de miel podría deberse a la zona geográfica y a la fuente floral (Jiménez et al., 2007). En este sentido, las abejas sin aguijón viven en colonias perennes y polinizan una amplia gama de plantas nativas y cultivadas, incluyendo productos básicos mundiales como el café (González et al., 2022). Los resultados de lactona en este análisis variaron de 8.67 a 31 meq /kg con una media de 24.24 ± 5.49 meq /kg (Tabla 5. La determinación de lactona es de interés, porque su hidrólisis aumenta el ácido libre (Cavia et al., 2007).

7.3.7. °Brix

El contenido de sólidos solubles se expresa como °Brix, en las muestras de miel de *S. mexicana* osciló entre 67.35% y 75.23% (Tabla 5). Los sólidos solubles en la miel incluyen azúcares, ácidos orgánicos y minerales (Nordin et al., 2018). El aumento de las precipitaciones durante el periodo de recolección del néctar puede influir en la disminución del rendimiento de la miel y de la dilución del néctar (Munro, 1929). El menor contenido de sólidos solubles de la miel de abejas sin aguijón puede estar relacionado con su mayor contenido de humedad (Lage et al., 2012). Los valores de sólidos solubles obtenidos de la miel de *Melipona* concuerdan con los resultados 72.8% a 77.3% reportados por Moo-Huchin et al. (2015) indicando similitudes entre la miel producida por abejas neotropicales.

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos de muestras de *Scaptotrigona mexicana* en la selva cálida húmeda de Puebla, México.

Muestra	Lactona (meq/kg)	Acidez total (meq/kg)	°Brix	Actividad de agua (Aw)	pH	Proteína (%)
1 P	22.33 ± 1.53^a	36 ± 2^{ab}	72.92 ± 0.06^{abc}	0.88 ± 0.006^{ab}	3.56 ± 0.02^a	0.34 ± 0.01^{abc}
2 P	17.33 ± 1.04^a	21 ± 1.5^b	75.23 ± 0.09^a	0.89 ± 0.005^b	4.63 ± 0.06^b	0.47 ± 0.05^{cde}
3 P	8.67 ± 1.53^a	29 ± 2.65^{ab}	73.59 ± 0.08^{abc}	0.88 ± 0.01^{ab}	3.74 ± 0.01^{ab}	0.49 ± 0.05^{def}
4 H	29.17 ± 1.04^a	63.16 ± 1.60^{ab}	72.71 ± 0.02^{abc}	0.79 ± 0.01^{ab}	3.57 ± 0.06^{ab}	0.25 ± 0.01^a
5 H	28.33 ± 1.53^a	66.83 ± 1.44^{ab}	74.83 ± 0.04^{ac}	0.77 ± 0.00^{ab}	3.48 ± 0.01^{ab}	0.61 ± 0.01^{fg}

6 A	31 ± 2.65^a	75 ± 1.73^{ab}	71.72 ± 0.07^{abc}	0.78 ± 0.01^{ab}	3.16 ± 0.01^{ab}	0.32 ± 0.02^{ab}
7 L	27 ± 2^a	94.67 ± 2.52^{ab}	69.45 ± 0.17^{bc}	0.89 ± 0.01^{ab}	3.49 ± 0.01^{ab}	0.56 ± 0.05^{ef}
8 H	27.33 ± 1.53^a	71.67 ± 3.06^{ab}	71.43 ± 0.05^{abc}	0.78 ± 0.0^{ab}	3.19 ± 0.01^{ab}	0.34 ± 0.02^{abc}
9 T	25.83 ± 0.7^a	76.17 ± 0.29^{ab}	71.10 ± 0.1^{abc}	0.76 ± 0.0^{ab}	3.16 ± 0.01^{ab}	0.25 ± 0.01^a
10 A	24.83 ± 0.29^a	91.50 ± 0.87^{ab}	70.94 ± 0.06^{abc}	0.77 ± 0.0^{ab}	2.95 ± 0.04^{ab}	0.33 ± 0.03^{ab}
11 T	24.33 ± 0.58^a	61 ± 2^{ab}	71.54 ± 0.08^{abc}	0.77 ± 0.0^{ab}	3.25 ± 0.01^{ab}	0.57 ± 0.03^{ef}
12 H	26.67 ± 0.58^a	74 ± 1^{ab}	$71.61 + 0.04^{abc}$	0.78 ± 0.00^{ab}	3.41 ± 0.02^{ab}	0.84 ± 0.04^h
13 A	28.67 ± 0.58^a	58.5 ± 0.87^{ab}	73.96 ± 0.11^{abc}	0.75 ± 0.00^{ab}	3.55 ± 0.01^{ab}	0.71 ± 0.03^{gh}
14 A	26.50 ± 0.5^a	82.17 ± 6.53^{ab}	72.39 ± 0.09^{abc}	0.77 ± 0.00^{ab}	3.43 ± 0.03^{ab}	0.73 ± 0.04^{gh}
15 C	29.33 ± 0.58^a	105.33 ± 0.58^a	71.18 ± 0.03^{abc}	0.78 ± 0.00^{ab}	2.95 ± 0.01^a	0.46 ± 0.02^{bcde}
16 C	28 ± 1^a	61.67 ± 1.15^{ab}	72.67 ± 0.02^{abc}	0.75 ± 0.00^a	3.17 ± 0.02^{ab}	0.73 ± 0.19^h
17 A	27.50 ± 0.5^a	76.83 ± 1.76^{ab}	$72.89 + 0.07^{abc}$	0.75 ± 0.003^{ab}	3.16 ± 0.01^{ab}	0.33 ± 0.02^{ab}
18 R	29.67 ± 4.73^a	98.67 ± 6.43^a	70.66 ± 0.01^{abc}	0.77 ± 0.001^{ab}	3.14 ± 0.02^{ab}	0.25 ± 0.01^a
19 R	25.67 ± 0.58^a	75 ± 1^{ab}	70.45 ± 0.2^{abc}	0.75 ± 0.001^{ab}	3.11 ± 0.11^{ab}	0.39 ± 0.04^{bcd}
20 P	18.67 ± 3.79^a	33.67 ± 4.62^{ab}	71.18 ± 0.03^{abc}	0.76 ± 0.002^{ab}	3.81 ± 0.03^{ab}	0.4 ± 0.09^{bcd}
21 P	20 ± 1^a	29 ± 2^{ab}	67.35 ± 0.88^b	0.76 ± 0.001^{ab}	3.83 ± 0.02^{ab}	0.4 ± 0.04^{bcd}
22 R	17.67 ± 1.15^a	57.67 ± 0.58^{ab}	$73.66 + 0.12^{abc}$	0.75 ± 0.001^{ab}	3.87 ± 0.03^{ab}	0.6 ± 0.01^{fg}
23 C	18.67 ± 2.08^a	67.33 ± 3.21^{ab}	70.39 ± 0.07^{abc}	0.77 ± 0.002^{ab}	3.77 ± 0.04^{ab}	1.15 ± 0.06^i
24 P	18.57 ± 0.58^a	32.33 ± 0.58^{ab}	69.89 ± 0.81^{abc}	0.75 ± 0.003^a	3.92 ± 0.02^b	0.33 ± 0.03^{ab}
Promedio	24.24 ± 5.49	64.09 ± 23.32	71.87 ± 1.76	0.79 ± 0.05	3.47 ± 0.38	0.08 ± 0.04
Min- Max	$8.67 - 31$	$21 - 105.33$	$67.35-75.23$	$0.75 - 0.9$	$2.95 - 4.63$	$0.24 - 1.22$
Curtosis	3.85	2.23	3.58	3.9	4.39	4.37
Asimetría	-0.09	-0.24	-0.35	1.59	1.02	1.23
Coeficiente de Variación	22.66	36.39	2.44	6.03	11.01	44.27

Como se muestra en los datos, letras diferentes (a-c) en la misma columna indican diferencias significativas entre mieles del mismo género y producidas en diferentes áreas geográficas, según lo determinado por la prueba de Dunn ($p \leq 0.05$).

7.3.8. Actividad del agua (Aw)

El agua es el segundo componente principal de la miel. La Aw de las muestras analizadas osciló entre 0.75 y 0.9, con una media de 0.79 ± 0.05 , como se muestra en la Tabla 5. Estos resultados son similares a los de Kek et al., (2017) que informaron de un valor de 0.76 ± 0.03 en la miel de abejas sin aguijón. La Aw podría aumentar con la cristalización de la glucosa en la miel, lo que conduce a la reducción de los sólidos solubles y resulta

en la dilución de la solución (da Silva et al., 2016). La Aw también depende del origen botánico de la miel, su nivel de madurez, las técnicas de procesamiento y las condiciones de almacenamiento (da Silva et al., 2016). Aunque no existen límites impuestos por las normas del Codex Alimentarius (2001), una Aw elevada podría conducir a la fermentación de la miel durante el almacenamiento, causada por la acción de levaduras osmotolerantes sobre los azúcares fructosa y glucosa, dando lugar a la formación de dióxido de carbono y alcohol etílico (Escuredo et al., 2013).

7.3.9. pH

El valor del pH se utiliza como referencia de la acidez del producto y es esencial para evaluar su calidad, ya que este parámetro indica si el medio es apto para el consumo seguro. Los valores de pH obtenidos en el presente estudio oscilaron entre 2.95 y 4.63, con una media de 3.47 ± 0.38 (Tabla 3). Xolalpa-Aroche et al. (2024) realizaron un estudio con muestras de miel de *M. beecheii* y *S. mexicana* de Veracruz y Puebla y reportaron valores que oscilaron entre 3.37 y 4.18 de pH. La variación entre las muestras de mieles de abejas sin aguijón podría verse afectada por el tipo de flora influenciada por las altas precipitaciones, que pueden alterar la composición del néctar recolectado por las abejas, lo que a su vez afecta el pH de la miel (Clearwater et al., 2018). Todas las muestras analizadas presentaban valores bajos de pH y altos niveles de acidez total. Como se mencionó anteriormente, la presencia de ácidos orgánicos, como el ácido glucónico y la lactona, impacta en el valor de pH de la miel, ya que un alto nivel de acidez total disminuye el pH (Moo-Huchin et al., 2015; Jiménez et al., 2016). Así, el pH bajo mejora la vida útil, textura y estabilidad de la miel (Zawawi et al., 2020). La naturaleza ácida de la miel de abeja sin aguijón ayuda a prevenir la presencia y el crecimiento de microorganismos; es un factor antimicrobiano, de ahí su uso para tratar enfermedades infecciosas como la tos y las heridas (Gela et al., 2021).

7.3.10. Proteínas

El contenido de proteína en la miel de abejas sin aguijón de este estudio oscilaron entre 0.24 y 1.22%, con una media de $0.08 \pm 0.04\%$ (Tabla 3). Estos resultados concuerdan con los comunicados por Lim et al., 2019, que informaron de proteínas en un rango de 0.2 a 0.8 g/100g en la miel de Malasia. Las proteínas de la miel pueden proceder de la abeja melífera, del néctar o del polen de la planta (de Almeida-Muradian et al, 2013). Las

principales proteínas de la miel son enzimas y se añaden durante el proceso de maduración de la miel. Las enzimas citadas son la diastasa (amilasa), que digiere el almidón en maltosa y es relativamente estable al calor y al almacenamiento. La invertasa (α -glucosidasa), que cataliza la conversión de sacarosa en glucosa y fructosa. Glucosa oxidasa y catalasa, que regulan la producción de peróxido de hidrógeno (factor antibacteriano de la miel) (Buba et al., 2013). La variabilidad en el contenido proteico de la miel de *S. mexicana* podría deberse a las enzimas aportadas por el néctar y a la diversidad de plantas silvestres visitadas por la abeja (González et al., 2022). No existe ninguna normativa o legislación que establezca valores de referencia para las proteínas de la miel (de Almeida-Muradian et al, 2013).

7.3.11. Color

El color de la miel es el primer atributo de calidad que percibe y juzga inmediatamente el consumidor e influye en su preferencia (Jiménez et al., 2016; Kek et al., 2017). Los resultados del color de la miel de *S. mexicana* se muestran en la Tabla 6. El valor mínimo en el parámetro Luminosidad (L) del color fue de 19.33 y el máximo de 39.44. El parámetro L representa la claridad u oscuridad, valores en la escala $L \leq 50$, se consideran miel oscura (Jiménez et al., 2016). Las muestras de miel de este estudio pertenecen a la categoría oscura. Chua et al. (2012) desarrollaron un estudio y demostraron que las mieles oscuras estaban correlacionadas con un alto contenido en minerales. Las coordenadas «a» y «b» de las muestras de miel mostraron valores positivos. En las muestras de miel, el valor mínimo para «a» fue de 1.74 y el máximo de 11.99, lo que indica la presencia de pigmentos rojos. En la escala b, el valor mínimo de «a», fue de 7,5 y el máximo de 32.05, lo que indica un color amarillento. Estos resultados fueron similares a los comunicados por Kek et al. (2017) para la miel de *Heterotrigona itama* ($L = 24.9 \pm 1.38$, $a = 1.90 \pm 0.49$, $b = 2.52 \pm 1.05$). El color de la miel es un parámetro asociado a la presencia de pigmentos; está influido por la composición del néctar, el origen botánico, el proceso de producción, la temperatura, el tiempo de almacenamiento, los minerales y el contenido fenólico (Bertoncelj et al., 2007). Los colores de la miel van del blanco casi incoloro al rojo oscuro, amarillo y ámbar (Shafiee et al., 2013). Los cambios de color pueden deberse a la intervención del apicultor o a diferentes métodos de producción y

conservación, como el uso de paneles viejos, el contacto con metales o la exposición a altas temperaturas y a la luz (Becerril-Sánchez et al., 2021).

Tabla 6. Color de muestras de miel de *Scaptotrigona mexicana* en la selva cálida húmeda de Puebla, México.

Muestra	Color				
	L	a	b	C	H
1 P	24.76 ± 0.6 ^{ef}	1.8 ± 0.08 ^a	12.67 ± 0.25 ^e	24.83 ± 0.61 ^d	8.12 ± 0.52 ^a
2 P	20.52 ± 0.45 ^b	4.37 ± 0.06 ^{de}	28.66 ± 0.13 ^o	20.98 ± 0.45 ^{ab}	8.68 ± 0.13 ^a
3 P	19.6 ± 0.23 ^a	5.28 ± 0.06 ^{fg}	26.21 ± 0.38 ⁿ	20.3 ± 0.24 ^a	11.38 ± 0.16 ^b
4 H	22.96 ± 0.17 ^d	2.68 ± 0.06 ^b	8.09 ± 0.11 ^{ab}	23.12 ± 0.17 ^c	18.36 ± 0.36 ^{gh}
5 H	32.28 ± 0.1 ⁱ	6.25 ± 0.12 ^{hi}	20.44 ± 0.24 ^k	32.88 ± 0.11 ⁱ	17.01 ± 0.12 ^{fg}
6 A	29.34 ± 0.21 ^{hi}	5.02 ± 0.23 ^f	15.2 ± 0.73 ^{gh}	29.77 ± 0.23 ^g	18.29 ± 0.51 ^{gh}
7 L	38.87 ± 0.37 ^q	4.99 ± 0.15 ^f	29.19 ± 0.43 ^o	39.19 ± 0.35 ⁿ	9.71 ± 0.41 ^{ab}
8 H	30.48 ± 0.18 ^k	5.77 ± 0.03 ^{gh}	16.18 ± 0.17 ^{hi}	31.02 ± 0.18 ^h	19.63 ± 0.19 ^h
9 T	29.55 ± 0.39 ^{ij}	8.47 ± 0.03 ^k	16.82 ± 0.08 ⁱ	30.74 ± 0.38 ^h	26.73 ± 0.14 ^k
10 A	37.63 ± 0.41 ^p	4.88 ± 0.05 ^{ef}	24.15 ± 0.47 ^m	37.94 ± 0.4 ^m	11.42 ± 0.27 ^b
11 T	26.29 ± 0.13 ^g	5.8 ± 0.13 ^{gh}	10.36 ± 0.29 ^c	26.93 ± 0.15 ^f	29.23 ± 0.31 ⁱ
12 H	29.45 ± 0.17 ^{hi}	5.02 ± 0.2 ^f	20.07 ± 0.25 ^k	29.87 ± 0.14 ^g	14.04 ± 0.5 ^{cd}
13 A	33.49 ± 0.25 ^m	6.37 ± 0.11 ⁱ	22.42 ± 0.54 ^l	34.09 ± 0.23 ^{jk}	15.87 ± 0.16 ^{ef}
14 A	27.09 ± 0.7 ^g	2.21 ± 0.09 ^{ab}	9.1 ± 0.75 ^b	27.18 ± 0.71 ^f	13.69 ± 0.78 ^c
15 C	35.93 ± 0.02 ^o	6.03 ± 0.02 ^{hi}	23.78 ± 0.02 ^m	36.44 ± 0.22 ^l	14.23 ± 0.05 ^{cde}
16 C	30.31 ± 0.4 ^{jk}	7.11 ± 0.13 ^j	18.10 ± 0.63 ^j	31.13 ± 0.42 ^h	21.47 ± 0.65 ⁱ
17 A	26.8 ± 0.03 ^g	5.21 ± 0.05 ^f	11.49 ± 0.07 ^d	27.34 ± 0.03 ^f	24.4 ± 0.17 ⁱ
18 R	25.43 ± 0.34 ^f	3.91 ± 0.54 ^{cd}	8.01 ± 0.59 ^a	25.73 ± 0.27 ^e	25.92 ± 1.42 ^{jk}
19 R	21.51 ± 0.4 ^c	3.41 ± 0.48 ^c	14.39 ± 0.31 ^{fg}	21.78 ± 0.4 ^b	13.32 ± 1.86 ^c
20 P	23.19 ± 0.41 ^d	3.76 ± 0.14 ^c	13.50 ± 0.32 ^{ef}	23.49 ± 0.4 ^c	15.59 ± 0.83 ^{ded}
21 P	34.51 ± 0.41 ⁿ	3.79 ± 0.15 ^c	15.74 ± 0.3 ^h	34.72 ± 0.41 ^k	13.56 ± 0.48 ^c
22 R	31.54 ± 0.31 ^l	11.32 ± 0.4 ^m	31.24 ± 0.64 ^p	33.52 ± 0.33 ^{ij}	19.93 ± 0.88 ^{hi}
23 C	24.31 ± 0.39 ^e	9.35 ± 0.34 ^l	16.94 ± 0.67 ⁱ	26.05 ± 0.31 ^e	28.93 ± 1.43 ^l
24 P	28.64 ± 0.29 ^h	6.53 ± 0.40 ⁱ	19.53 ± 0.5 ^k	29.37 ± 0.28 ^g	18.5 ± 1.36 ^{gh}
Promedio	28.52 ± 5.2	5.39 ± 2.16	18.01 ± 6.63	29.1 ± 5.24	17.42 ± 6.11
Min- Max	19.33 - 39.44	1.74 - 11.99	7.5 - 32.05	20.02 - 29.73	7.72 - 31.2

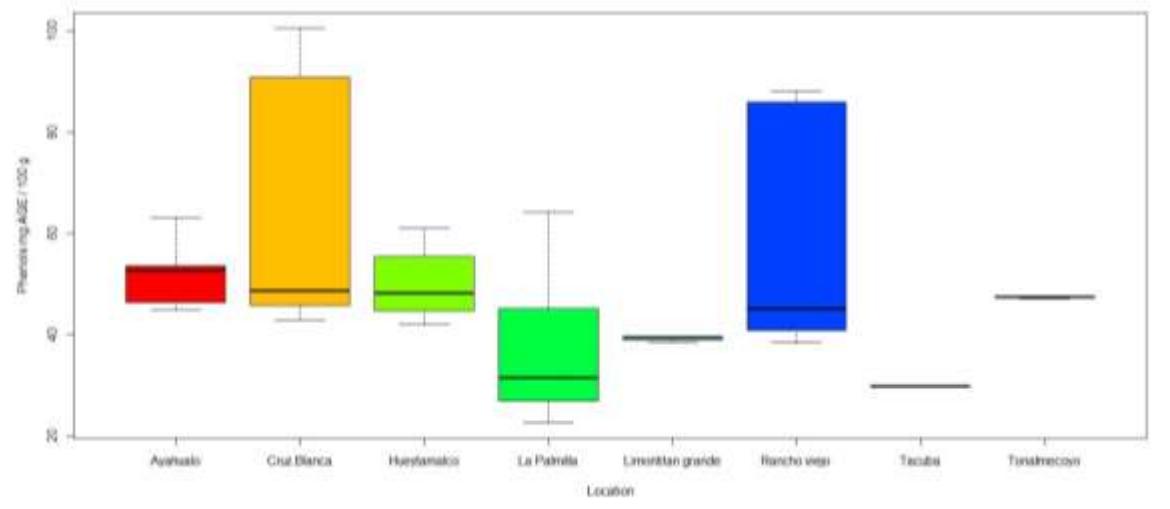
Como se muestra en los datos, letras diferentes (a-h) en la misma columna indican diferencias significativas entre mieles del mismo género y producidas en diferentes áreas geográficas, según lo determinado por la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

7.3.12. Fenoles Totales

En la figura 9 se muestran los resultados de los fenoles totales en la miel de *S. mexicana* de diferentes regiones. Los resultados se agruparon por regiones debido a la diferente vegetación acorde con la zona geográfica. La región de Cruz Blanca presentó un mayor contenido de compuestos fenólicos, que osciló entre 45.39 y 100.39 mg AGE/100g, mientras que la región de Tacuba presentó los compuestos fenólicos más bajos (29.69 mg AGE/100g). Se encontraron diferencias significativas entre las regiones $p<0.005$. El tamaño del efecto mostró que la región es importante en el contenido fenólico ($\eta^2 = 0.38$). Jiménez et al. (2016) reportaron un contenido de fenoles totales de 25.85 a 40.1 mg AGE/100g en muestras de miel de *S. mexicana* en Veracruz, México. Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas (Duarte et al., 2012) presentes en el néctar, polen o propóleos (Makawi et al., 2009). Estos compuestos son uno de los principales componentes funcionales de la miel (Ruiz-Ruiz et al., 2017). En los últimos años han recibido especial atención por parte de grupos de investigación, considerando su papel en la prevención de enfermedades asociadas al estrés oxidativo, aterosclerosis, cáncer, infecciones y lesiones (Alvarez-Suarez et al., 2012). También se ha mencionado que el contenido fenólico de la miel es parcialmente responsable de la actividad antibacteriana y antioxidante de la miel, ya que en la que pueden influir otros compuestos como las vitaminas C y E (Jiménez et al., 2016). Algunos estudios revelaron altos niveles de compuestos fenólicos en la miel de abejas sin aguijón, tales como, ácido trans-cinámico, kaempferol, ácido p-cumárico, catequina, ácido ferúlico, hesperidina, ácido elágico, rutina ycrisina (Sousa, et al., 2016; Pimentel et al., 2022). Los compuestos fenólicos se han utilizado como indicadores químicos para determinar diferentes orígenes botánicos y geográficos de la miel (Cavazza et al., 2013; Das et al., 2015) y pueden influir en las propiedades organolépticas (color, sabor o aroma) de la miel (Shamsudin et al., 2022). La variación en la concentración fenólica puede depender de la fuente botánica del néctar, la estación, las condiciones de almacenamiento, la zona geográfica, las condiciones ambientales, el manejo apícola, la zona de forrajeo y las especies de abejas (Kek et al., 2014; Biluca et al., 2016; Moreira et al., 2023). La variabilidad del contenido fenólico en las muestras de miel de *S. mexicana* podría estar influida por la altitud de los lugares de cultivo de la planta, que se considera un factor ambiental importante que

influye en la composición y la cantidad de compuestos bioactivos de las plantas (Suleiman et al., 2020).

A)



B)

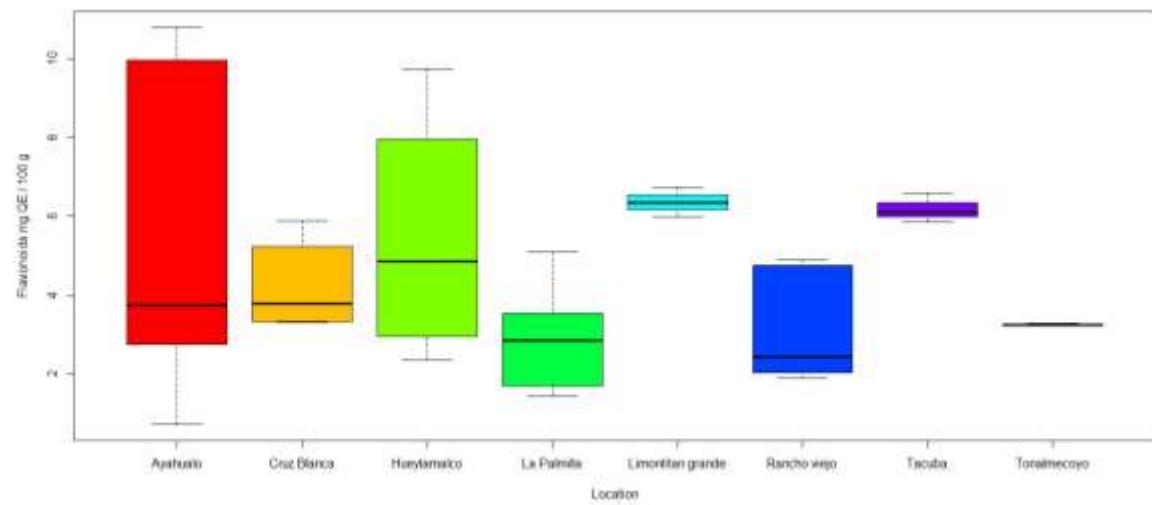


Figura 9. Gráfico de cajas que explican de la variación en el contenido de compuestos fenólicos (A) y flavonoides (B). Se observaron variaciones significativas entre regiones según la prueba de Kruskal-Wallis y Dunn con corrección de Bonferroni para discernir posibles diferencias entre las regiones ($p < 0,05$).

7.3.13. Flavonoides

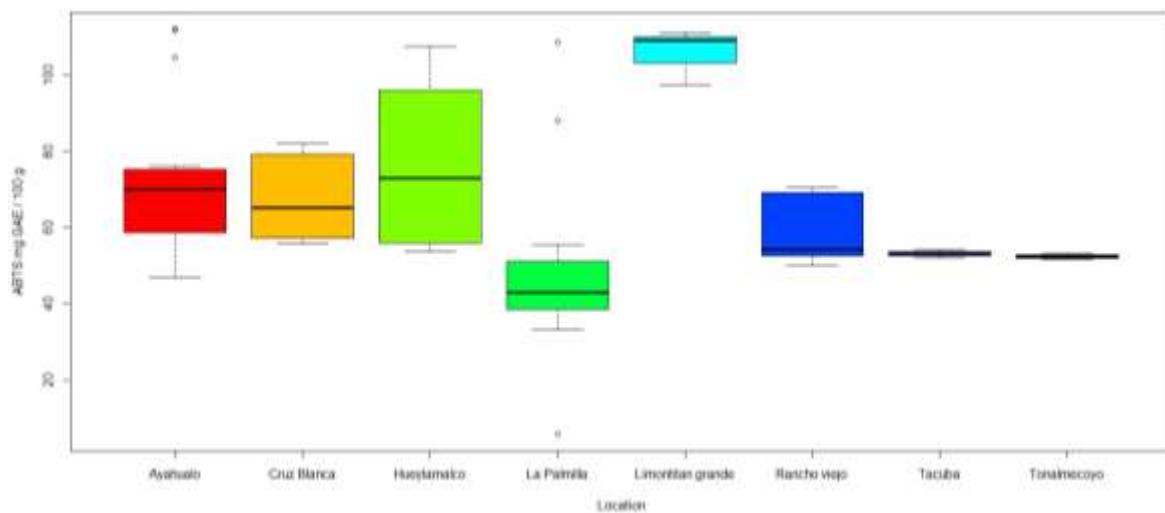
En la figura 9 se muestran los flavonoides presentes en la miel de *S. mexicana* de diferentes regiones. Estos resultados mostraron que las muestras de la región de Ayahualo, tuvieron flavonoides en un rango de 0.70 a 10.80 mg QE/100g, representando el contenido más alto de flavonoides, mientras que las muestras de la región de Tonalmecoyo presentaron el contenido más bajo de flavonoides, con un rango de 3.2 a 3.27 mg QE/100g. Se encontraron diferencias significativas entre las regiones $p<0.005$. El estudio mostró que el origen botánico es un factor importante en el contenido de flavonoides de la miel ($\eta^2 = 0.26$). El contenido de flavonoides depende del origen, lo que explica la variabilidad en el contenido de flavonoides de las muestras; la miel contiene varios flavonoides como apigenina, pinocembrina, queracetina, galangina, crisina, hesperetina (Turkmen et al., 2006). El contenido de ácidos fenólicos y flavonoides en la miel depende de la fuente botánica del néctar, de la estación, de la zona geográfica (altitud y latitud), de las condiciones ambientales, de la zona de pecoreo y de la especie de abeja (Kek et al., 2014; Biluca et al., 2016; Moreira et al., 2023). La altitud está relacionada con la variación de luz, temperatura y radiación que reciben los lugares donde crecen las plantas, lo que afecta a la estimulación de la producción de metabolitos secundarios. Las mayores altitudes se caracterizan por temperaturas más bajas pero mayor radiación UV-B, lo que podría generar mayores niveles de fenólicos y flavonoides (de Abreu & Mazzafera 2005; Cirak & Radusiene, 2019). Por ejemplo, Sousa y colegas (2016) observaron un rango de flavonoides de 1.9 a 4.4 mg QE/100g en la miel de *Melipona* una abeja sin aguijón estos resultados fueron como este estudio.

7.3.14. Actividad Antioxidante (DPPH y ABTS)

Los resultados del ensayo DPPH antioxidante *in vitro* oscilaron entre 3.5 y 18.27 mg EAA/100g y los resultados del ensayo ABTS oscilaron entre 5.83 y 112.11 mg EAA/100g (Figura 10). Se encontraron diferencias significativas entre las regiones $p<0.05$. El análisis del tamaño del efecto (η^2) mostró que los extractos de miel de *S. mexicana* tenían un impacto considerable en la actividad antioxidante ($\eta^2 = 0.49$) para el ensayo ABTS y ($\eta^2 = 0.37$) para DPPH. En este estudio, las muestras de miel con mayor actividad antioxidante fueron las de Hueytamalco y Limontitán grande, regiones que se caracterizan por el cultivo de manzana, pera, aguacate, café y naranja. De acuerdo con

Shakoori et al., (2024), la actividad antioxidante depende directamente del origen vegetal y de la ubicación geográfica del lugar de alimentación de las abejas. Los antioxidantes son moléculas que pueden prevenir el daño de los radicales libres en las células y ayudar a prevenir ciertas enfermedades, como las cardiovasculares, el envejecimiento, las cardiopatías, el cáncer y la inflamación (Zehiroglu & Ozturk, 2019; Martinello & Mutinelli, 2021). La miel con mayor actividad antioxidante se recolectó en la región de Limontitán grande y Rancho viejo (Figura 10), lo que puede estar relacionado con el alto contenido fenólico y de flavonoides en las muestras. Varias investigaciones han encontrado una relación entre los compuestos fenólicos y flavonoides de la miel y la actividad antioxidante en tubos de ensayo (Ruiz-Ruiz et al., 2017; Tuksitha et al., 2018; Mahmood et al., 2020; Shamsudin et al., 2022). La actividad antioxidante de la miel está relacionada con la estructura molecular de los fenoles, concretamente con el número de grupos hidroxilo y la posición de los anillos fenólicos, que son muy importantes para el buen funcionamiento de los antioxidantes (Martinello & Mutinelli, 2021). El potencial antioxidante de la miel involucra muchos componentes, y las diferencias en la actividad antioxidante en mieles de *S. mexicana* podrían deberse a la presencia de componentes como vitamina E, vitamina C y carotenoides (Escuredo et al., 2013; Jiménez et al., 2016). Los componentes antioxidantes podrían tener su origen principalmente en el néctar (por ejemplo, vitaminas y compuestos fenólicos), el polen (por ejemplo, proteínas y aminoácidos), la abeja (por ejemplo, enzimas) y las condiciones de procesamiento (por ejemplo, productos de la reacción de Maillard) (Seraglio et al., 2021).

A)



B)

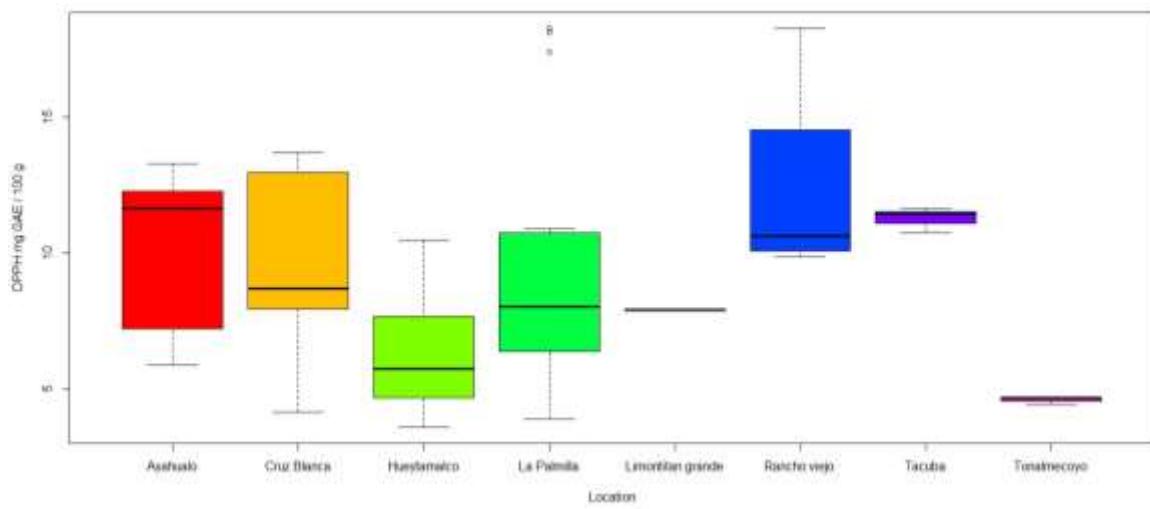


Figura 10. Gráficos de cajas que explican el ensayo ABTS y DPPH expresado en mg Equivalentes de Ácido Gálico. Se observaron variaciones significativas entre regiones a partir de la prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn con corrección de Bonferroni para discernir posibles diferencias entre las regiones ($p < 0,05$).

10.6.14.1. Matriz de dispersión y correlación de Spearman

Se observó una correlación positiva entre el color rojo (a) y los compuestos fenólicos ($r=0.43$, $p<0.001$) (Figura 11). Esto indica que un mayor contenido en fenoles se asocia a más tonos rojizos en la miel. Sin embargo, el coeficiente de determinación ($\rho = 0.44$, p^2

= 0.19) sugiere que el 19% de la variabilidad del color rojo a puede explicarse por el contenido fenólico. Según Otmani et al., (2021) el color es un parámetro que indica la presencia de pigmentos, como flavonoides y carotenoides, presentes en la miel. Jiménez y colaboradores (2016) observaron en su estudio una correlación significativa ($r = 0.827$) entre los fenoles y el parámetro de color “b”. El color amarillo mostró una correlación positiva ($r=0.43$, $p<0.001$) con la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH. Los fenoles y los flavonoides mostraron una relación significativa con la actividad antioxidante (ABTS) ($r=0.49$, $p<0.001$) y ($r=0.43$, $p<0.001$) respectivamente. Nuestros resultados son similar a lo reportado por Duarte et al. (2012), quienes mostraron una correlación positiva entre el contenido fenólico total y el contenido de flavonoides ($r=0.53$; $r=0.534$ $p<0.01$), respectivamente, en relación con el ensayo DPPH. Los compuestos fenólicos se han asociado con las actividades antioxidantes en ensayos *in vitro* (Tuksitha et al., 2018; Mahmood et al., 2020). Duarte et al. (2012) correlacionaron el contenido de fenoles y flavonoides con la actividad antioxidante de la miel de abejas sin aguijón. Turkmen et al. (2006) informaron de que los flavonoides se han asociado con las propiedades antioxidantes. La actividad captadora de radicales de los flavonoides depende de la estructura molecular (Ruiz-Ruiz et al., 2017), pero los productos apícolas son sustancias naturales multicomponentes y, por lo tanto, también contienen otras sustancias con actividad antioxidante, como minerales, aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos orgánicos y enzimas, pero en concentraciones más bajas que los fenoles (Martinello y Mutinelli, 2021).

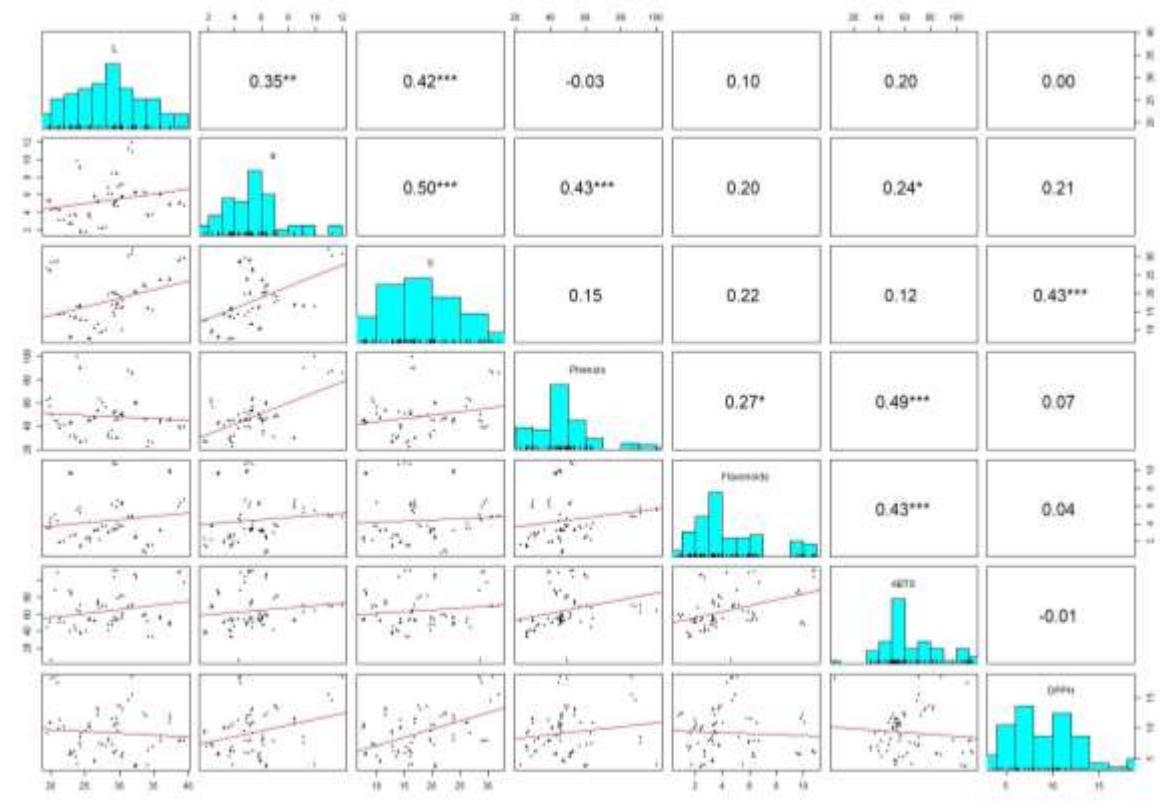


Figura 11. Matriz de diagramas de dispersión ilustra las relaciones por pares entre el color, los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante (ensayos ABTS y DPPH) de la miel de *Scaptotrigona mexicana*. Cada gráfica muestra el coeficiente de correlación de Spearman para cada par de variables. La distribución de cada una de las variables numéricas se muestra mediante los histogramas en la diagonal principal del gráfico. Códigos de significación: *<0.001; **<0.01; *<0.05.**

7.3.14.1. Análisis jerárquico de conglomerados

El análisis jerárquico de conglomerados exploró las diferencias y similitudes en los parámetros fisicoquímicos de la miel de *S. mexicana*. En este caso, se utilizó para analizar la similitud entre muestras de miel de abejas *S. mexicana* de varias localidades de Puebla y Veracruz, basándose en características fisicoquímicas. Como se muestra en la figura 12, las muestras se agrupan en dos conglomerados principales (indicados por los colores rosa y azul). El análisis puede mostrar diferencias en la composición de la miel entre las distintas localidades, que podrían estar relacionadas con factores geográficos, climáticos o locales, como las precipitaciones. Por ejemplo, las muestras de miel de La Palmilla mostraron una mayor humedad, lo que podría estar relacionado con la elevada pluviosidad de esta zona en comparación con las demás regiones. El diagrama de conglomerados con elipses de confianza de las variables fisicoquímicas puso de

manifiesto la presencia de dos grupos distintos (%) de muestras de miel de *S. mexicana* (Figura 13). El gráfico reduce la dimensionalidad de los datos a dos componentes principales: Dimensión 1 (Dim1) y Dimensión 2 (Dim 2). La Dim 1 explica el 26,6 % de la variación entre las muestras y la Dim2 explica el 17,4 % del comportamiento de las variables analizadas. Los dos conglomerados indican que las muestras de miel se clasifican en dos grupos distintos con respecto a sus parámetros fisicoquímicos. El conglomerado número 1 se caracteriza por valores más altos en los siguientes parámetros fisicoquímicos Grados Brix (concentración de azúcar), azúcares reductores, acidez libre, lactona, pH, humedad, Aw, proteína, diastasa, HMF y minerales. Esto podría significar que la miel producida en esta región es más dulce, más ácida y tiene mayor contenido de agua.

Las muestras de este conglomerado proceden de una región de mayor latitud (20,018477), lo que sugiere que el clima, la temperatura y la vegetación pueden influir en las características fisicoquímicas de la miel. El conglomerado número 2 se caracteriza por valores más bajos en los parámetros fisicoquímicos: grados Brix (concentración de azúcar), azúcares reductores, acidez, lactona, pH, humedad, Aw, proteína, diastasa, HMF y minerales. Estas muestras presentaban un mayor contenido de humedad que podría estar relacionado con las altas precipitaciones en comparación con las otras regiones. Las muestras de este conglomerado proceden de una región de menor latitud, lo que podría estar relacionado con valores más altos de los parámetros anteriores, debido a diferencias en el clima o en las condiciones locales. Diversos estudios han identificado varios factores que influyen en las propiedades fisicoquímicas de la miel, como la zona geográfica y las condiciones ambientales y climáticas en las que crecen las plantas, que determinan su metabolismo y afectan directamente a la composición del néctar ofrecido a la abeja para la producción de miel (Sousa et al., 2016; Mokaya et al., 2022).

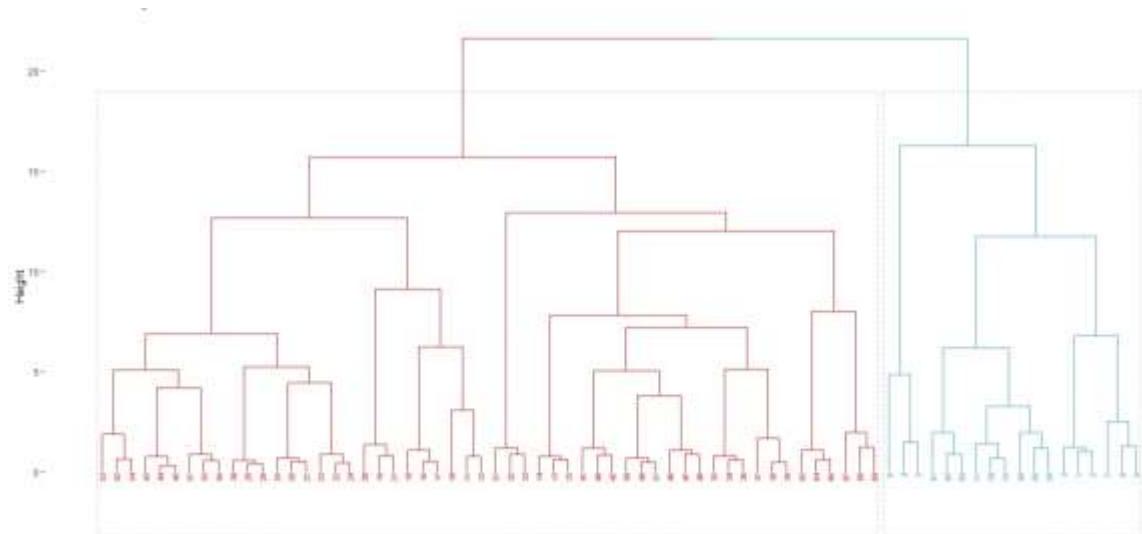


Figura 12. Análisis de conglomerados (clustering jerárquico) de muestras de miel de diferentes localidades de la especie *Scaptotrigona mexicana* formados a partir de la similitud en los parámetros fisicoquímicos.

Figura 13. Diagrama de análisis de conglomerados que muestra la agrupación de diferentes muestras de miel de *Scaptotrigona mexicana* según sus parámetros fisicoquímicos el óvalo alrededor de cada conglomerado muestra la distribución de las muestras. Cada punto y triángulo del gráfico corresponden a identificadores específicos de cada muestra de miel. Las muestras dentro del mismo conglomerado son similares entre sí.

7.4. Análisis quimiométricos (rmn ^1h)

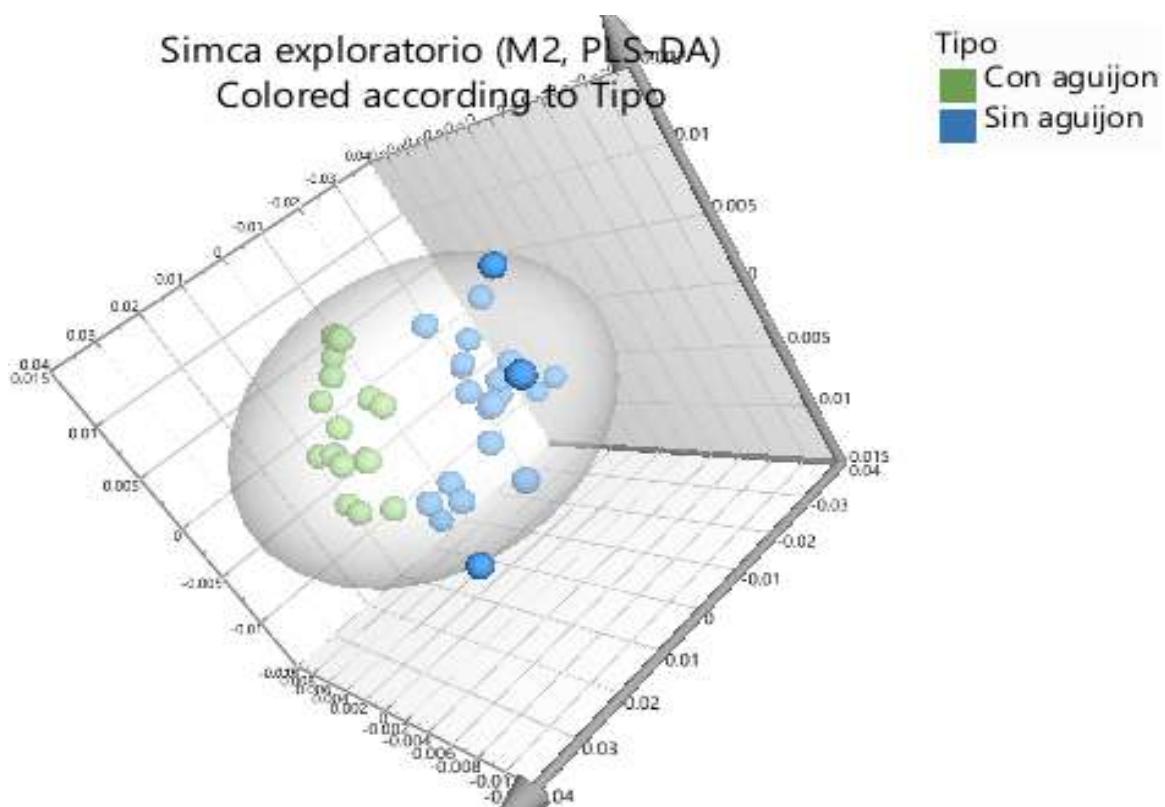


Figura 14. Gráfica de puntuación PLS-DA derivadas de espectros de RMN 1H a 700 MHz de extractos de miel con agujón y sin agujón.

Para el análisis de resonancia magnética se utilizaron un total de 40 muestras. 20 muestras fueron de miel de abejas sin agujón y 20 muestras fueron de miel de *A. mellifera* de la misma ecoregión de la Sierra Templada con el objetivo de identificar si existían diferencias entre los dos tipos de miel. En el conjunto de datos analizados las diferencias se deben al origen entomológico y son fácilmente separables. Las diferencias también pueden atribuirse a que las abejas generalmente viven en diferentes ecosistemas. Los métodos de proyección para la clasificación, como PLS-DA, permiten generar modelos de clasificación eficientes. La Figura 14 muestra los gráficos de puntuación PLS-DA (en 3D, correspondientes a PC1/PC2/PC3) derivados de los espectros de RMN de los extractos de miel, que visualizan una buena separación entre estos extractos.

En la figura 15 se muestra un análisis exploratorio de tipo OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis) utilizado para distinguir grupos en función de

variables predictoras. Las muestras se agrupan visiblemente en dos grupos diferenciados en el eje $t[1]$, lo cual indica que el modelo fue capaz de discriminar entre muestras de miel de abejas con aguijón (*A. mellifera*) y abejas sin aguijón (*S. mexicana*) agrupándolas en dos clústeres distintos. Dentro de cada grupo los puntos están relativamente agrupados, lo cual sugiere una homogeneidad interna. Este resultado respalda la hipótesis de que el origen entomológico de la miel influye en sus características fisicoquímicas.

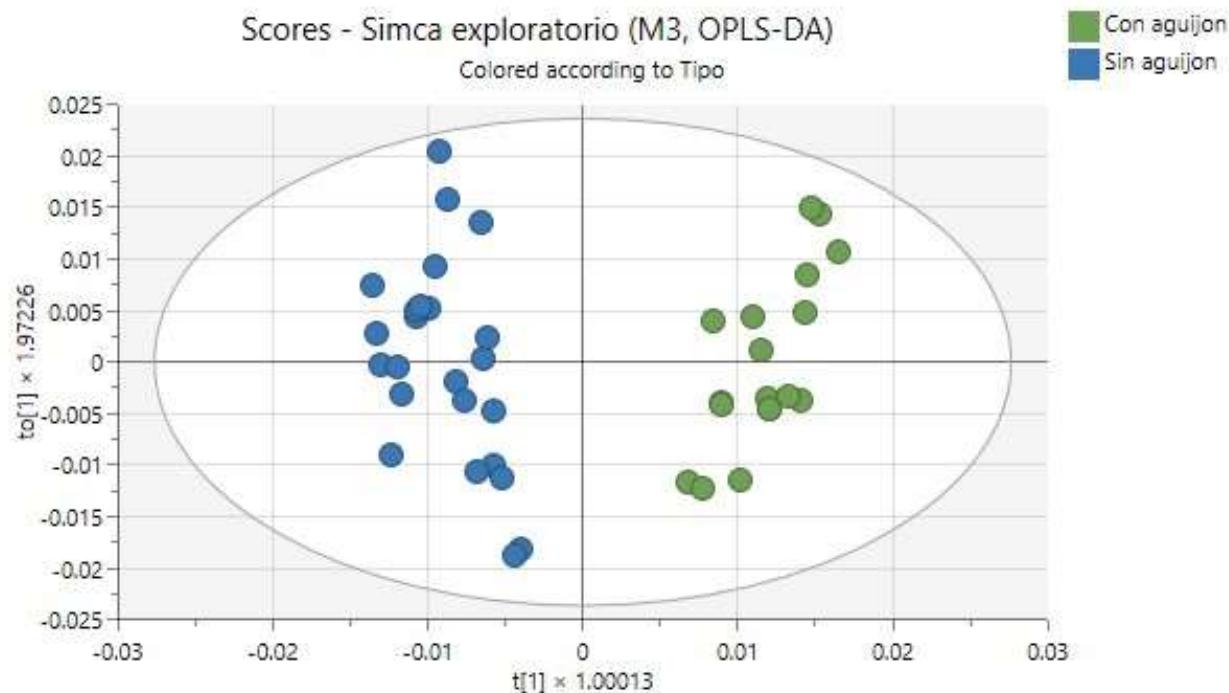


Figura 15. OPLS-DA en muestras de miel de abejas sin aguijón (*Scaptotrigona mexicana*) y con aguijón (*Apis mellifera*).

7.5. Tercer etapa

7.5.1. Fermentación

En la figura 16 se muestran los resultados de la cinética de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* en 5 concentraciones distintas de miel de *S. mexicana*. Se utilizó como control negativo caldo MRS sin fuente de carbono, como control positivo caldo MRS con glucosa. Como se puede observar en la gráfica el crecimiento de la bacteria con el 5% de la miel fue lento y menor comparado con las demás concentraciones probablemente debido a la falta de nutrientes para poder crecer mejor. Posteriormente el crecimiento bacteriano fue mejorando con la adición de mayor cantidad de miel (10%, 15% y 20%). Sin embargo con la adición de miel al 25% disminuyó el crecimiento esto posiblemente pudo suceder debido a un mayor contenido de azúcares, mayor contenido de compuestos fenólicos que pudieron inhibir el desarrollo. El proceso de crecimiento en los medios de cultivo utilizando como fuente de carbono carbohidratos de la miel favoreció al desarrollo de las bacterias ácido lácticas, esto puede ser debido a que están adaptadas a vivir en ambientes microaerófilos ricos en nutrientes que incluyen azúcares y aminoácidos (Vrancken, *et al.*, 2008). Otro factor que favoreció al crecimiento fue el elevado contenido de humedad en la miel (30.55%) esto permite el crecimiento de microorganismos lo que ocasiona procesos de fermentación (Perez-Perez *et al.*, 2007). Algunas variables del proceso fermentativo como el pH, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes tienen una influencia significativa sobre el metabolismo y funcionamiento de las células, afectando su velocidad específica de crecimiento (Rinaldi *et al.*, 2006).

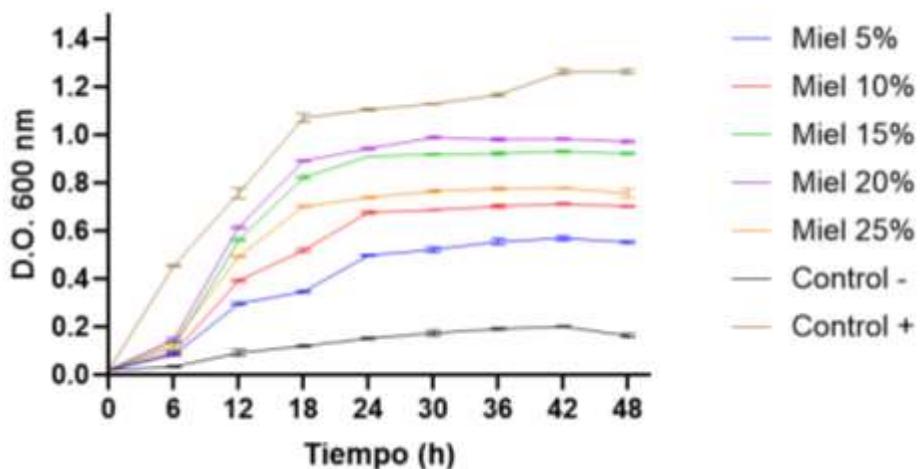


Figura 16. Cinética de crecimiento monitoreada por densidad óptica para *Lactobacillus rhamnosus* usando distintas concentraciones de miel de *S. mexicana* como fuente de carbono durante 48 horas a 37°C.

Para el análisis de los resultados del crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* se aplicaron distintos modelos matemáticos que permitieron analizar el crecimiento bacteriano. Primero se utilizó el modelo de Monod (Figura 17 y Tabla 7) con el objetivo de conocer la afinidad de la bacteria por el medio de cultivo modificado con miel.

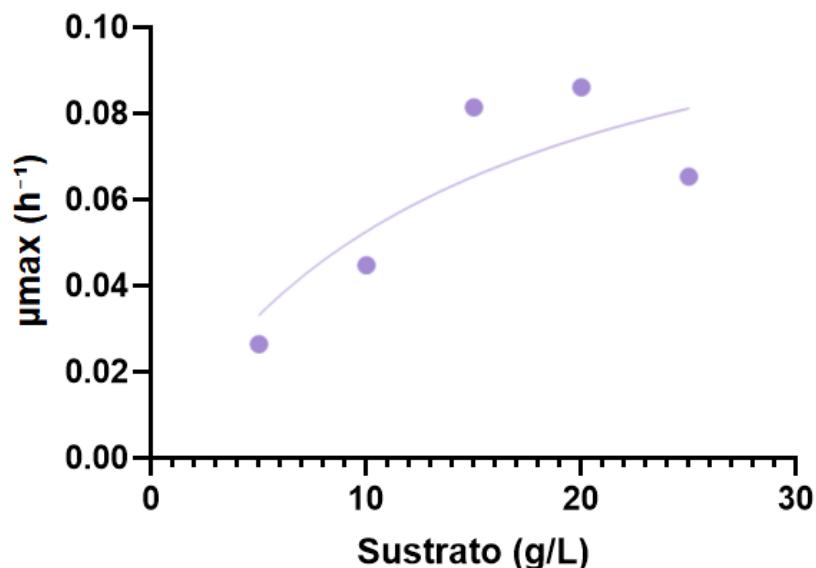


Figura 17. Modelo de Monod para *Lactobacillus rhamnosus* utilizando como sustrato miel de *S. mexicana* en distintas concentraciones sustrato (g/L).

Tabla 7. Parámetros de crecimiento bacteriano para el modelo de Monod.

Parámetro	Valor
μ_{max} (h ⁻¹)	0.1273
K _s	14.19
Bondad de ajuste (R^2)	0.7028

μ_{max} = Velocidad máxima de crecimiento
K_s = Constante de semivelocidad
 R^2 = coeficiente de determinación.

Posteriormente se utilizó el modelo de Haldane (Figura 18 y Tabla 8) ya que este modelo considera las variables que pueden influir en la inhibición del crecimiento (como compuestos fenólicos o presión osmótica por los azúcares de la miel).

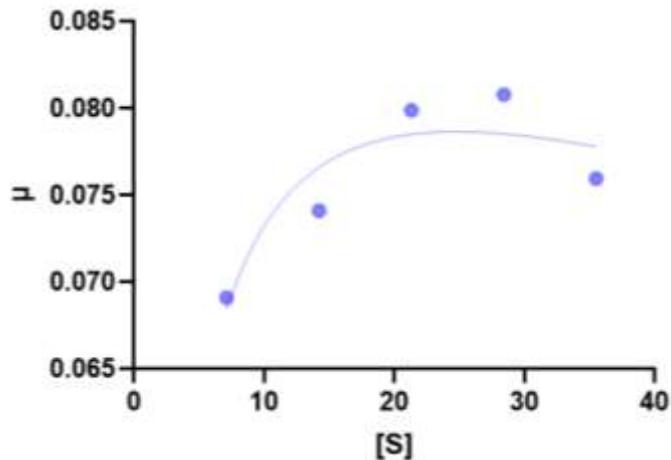


Figura 18. Modelo de Haldane para *Lactobacillus rhamnosus* utilizando como sustrato miel de *S. mexicana* en distintas concentraciones sustrato (g/L). μ =tasa de crecimiento específica.

Tabla 8. Parámetros de crecimiento bacteriano para el modelo de Haldane.

Parámetro	Valor	
μ_{max} (h ⁻¹)	0.09456	máxima de crecimiento
K _s	2.509	semivelocidad
K _i	244.7	inhibición determinación
Bondad de ajuste (R ²)	0.8088	
Con el modelo de cálculo del sustrato		Haldane se hizo el óptimo para el crecimiento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> como se muestra a continuación:

Cálculo del sustrato óptimo (S_{opt}):

Fórmula:

$$S_{opt} = \sqrt{K_s \cdot K_i}$$

$$S_{opt} = \sqrt{2.509 \cdot 244.7} = 24.77 \text{ g/L (18%)}$$

Los resultados indicaron que el mayor crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* fue en una concentración de 24.77 g/L de miel equivalente a la adición del 18%.

Finalmente se utilizó el modelo de Gompertz modificado que fue el que mejor describió el crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* (Figura 19 y Tabla 9).

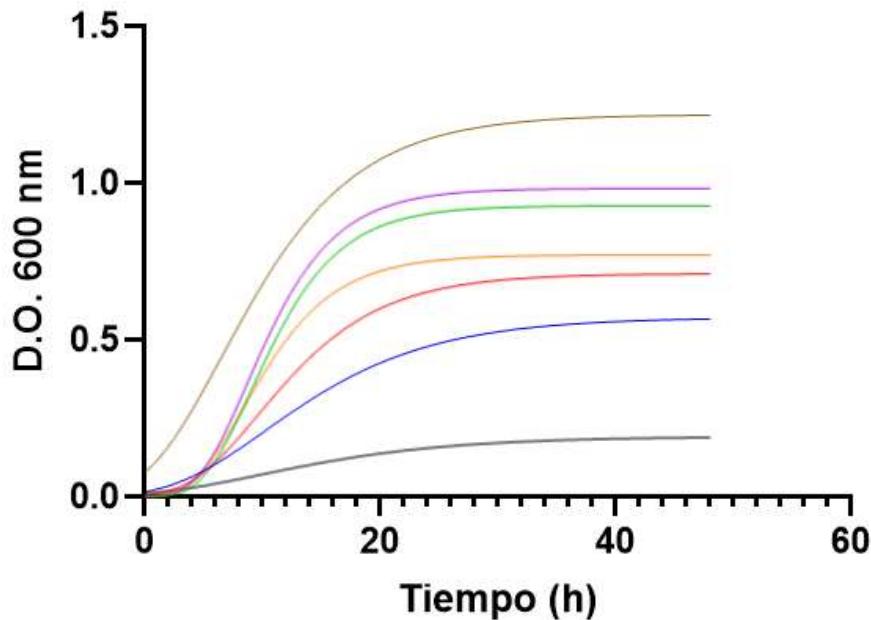


Figura 19. Curvas de crecimiento adaptado al Modelo de Gompertz modificado para *Lactobacillus rhamnosus* utilizando como sustrato miel de *S. mexicana*.

Tabla 9. Parámetros de crecimiento bacteriano para el modelo de Gompertz modificado de la muestra de La Palmilla de *Scaptotrigona mexicana*.

Miel (%)	A (D.O.600)	$\mu_{\text{max}} (\text{h}^{-1})$	$\lambda (\text{h})$	Bondad de ajuste (R^2)
5	0.5710	0.02645	2.295	0.9589
10	0.7102	0.04481	3.816	0.9387
15	0.9274	0.08147	4.889	0.9299
20	0.9822	0.08610	4.521	0.9099
25	0.7700	0.06537	4.060	0.9282

A=Densidad óptica máxima alcanzada. μ_{max} =Tasa máxima de crecimiento. λ = Tiempo de fase lag. R^2 = coeficiente de determinación.

Posteriormente se realizó un Modelo de regresión cuadrática para identificar cual fue el sustrato óptimo en el que mejor crece la bacteria (Figura 20).

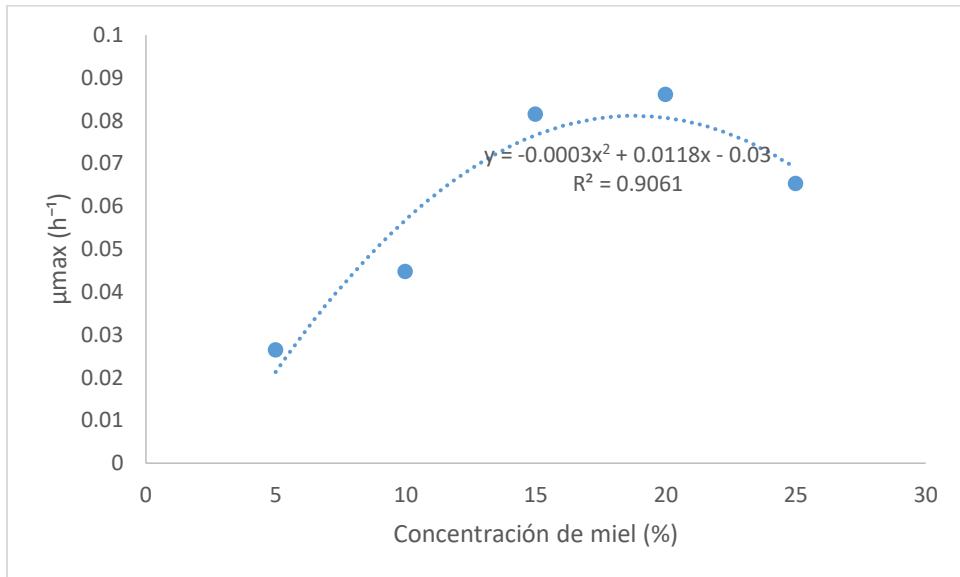


Figura 20. Curvas de crecimiento adaptado al Modelo de regresión cuadrática. μ_{max} =Tasa máxima de crecimiento vs concentración de miel en %.

$$y = ax^2 + bx + c$$

$$\text{Sustrato óptimo} = -b / 2a$$

$$S_0 = -0.0118 / (2)(-0.0003) = 19.66\%$$

EL modelo de regresión cuadrática indico que el mejor porcentaje de miel que permite un crecimiento viable de *L. rhamnosus* fue con la adición del 20%.

Una vez determinado el porcentaje en el cual *L. rhamnosus* presentó el mayor crecimiento, se llevo a cabo un proceso de fermentación controlada utilizando tres muestras de miel (muestras 2, 7 y 18) (Figura 21). Estás muestras fueron seleccionadas con base en sus parámetros físicos, incluyendo pH, contenido de humedad, actividad de agua, contenido de azúcares y acidez.

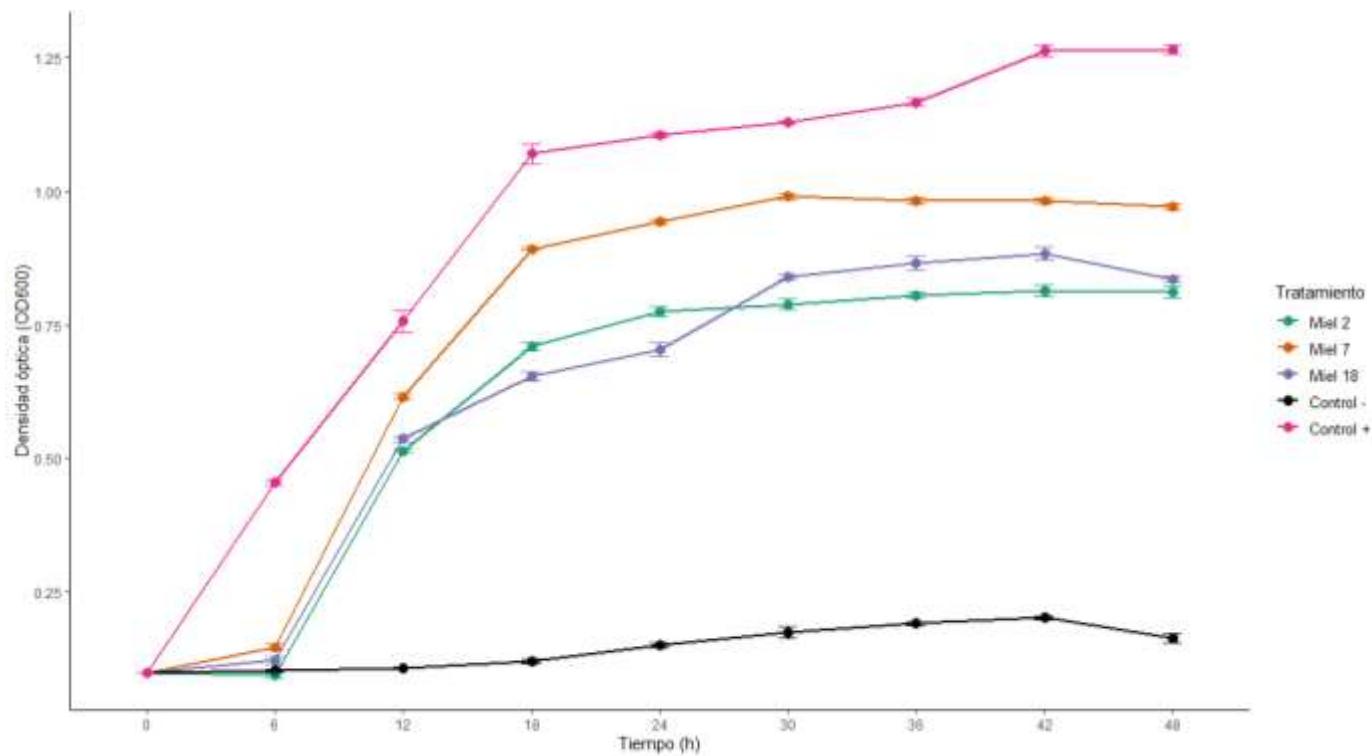


Figura 21. Cinética de crecimiento monitoreada por densidad óptica para *Lactobacillus rhamnosus* utilizando 3 muestras de miel de *Scaptotrigona mexicana* (2, 7 y 18) como fuente de carbono durante 48 horas a 37°C. Los datos se expresan como media ± desviación estándar.

La Figura 21 muestra las curvas de crecimiento microbiano determinadas mediante densidad óptica a 600 nm (OD 600) en función del tiempo, durante un periodo de incubación de 48 h. Se evaluaron cinco tratamientos: tres medios suplementados con miel de *S. mexicana* (2, 7 y 18), un control negativo (sin glucosa) y un control positivo (con glucosa). El control positivo presentó el mayor crecimiento microbiano a lo largo del experimento, con un crecimiento sostenido desde las primeras 6 horas y valores máximos cercanos a 1.25 hacia las 48 horas. En contraste el control negativo mostró un crecimiento limitado durante todo el periodo de incubación, con valores de OD600 inferiores a 0.25, lo que confirma la ausencia de condiciones favorables para el desarrollo microbiano. Los tratamientos suplementados con miel mostraron patrones de crecimiento intermedios. La miel 7 promovió un crecimiento más elevado y sostenido, alcanzando valores máximos de crecimiento cercanos a 1 alrededor de las 30 horas, seguido de una fase de estabilización. La miel 18 presentó un crecimiento progresivo hasta las 42 horas, mientras que la miel 2 mostró un crecimiento más moderado, estabilizándose a partir de las 30 horas. Las diferencias en el crecimiento pueden deberse a las diferencias en el

contenido de azúcares, actividad de agua, contenido fenólico y acidez entre las muestras. Shamala *et al.*, (2000) realizaron estudios *in vivo* e *in vitro* en los que demostraron que la miel es capaz de promover el crecimiento de bacterias ácido lácticas contribuyendo de manera positiva al equilibrio del microbioma humano. En este contexto, la incorporación de componentes probióticos o prebióticos en la dieta ha sido asociada con un incremento en la actividad de las enzimas digestivas, una mayor diversidad de la microbiota intestinal, desarrollo de las microvellosidades intestinales y la capacidad de absorción de nutrientes en organismos cultivados (Hasyimi *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos en el presente estudio son congruentes con lo reportado por Razali *et al.*, (2019), quienes evaluaron el efecto prebiótico de la miel de *Heterotrigona itama* mediante la adición de las cepas *Lactobacillus acidophilus* y *L. brevis*. En dicho trabajo, ambas cepas mostraron un crecimiento significativo en presencia de miel, lo que confirmó su potencial como sustrato prebiótico. En conjunto esta evidencia respalda el papel de la miel, particularmente de las abejas sin aguijón, como un ingrediente funcional capaz de modular positivamente el crecimiento de bacterias ácidas lácticas.

7.6. Cambios fisicoquímicos post fermentación

7.6.1. Parámetros fisicoquímicos

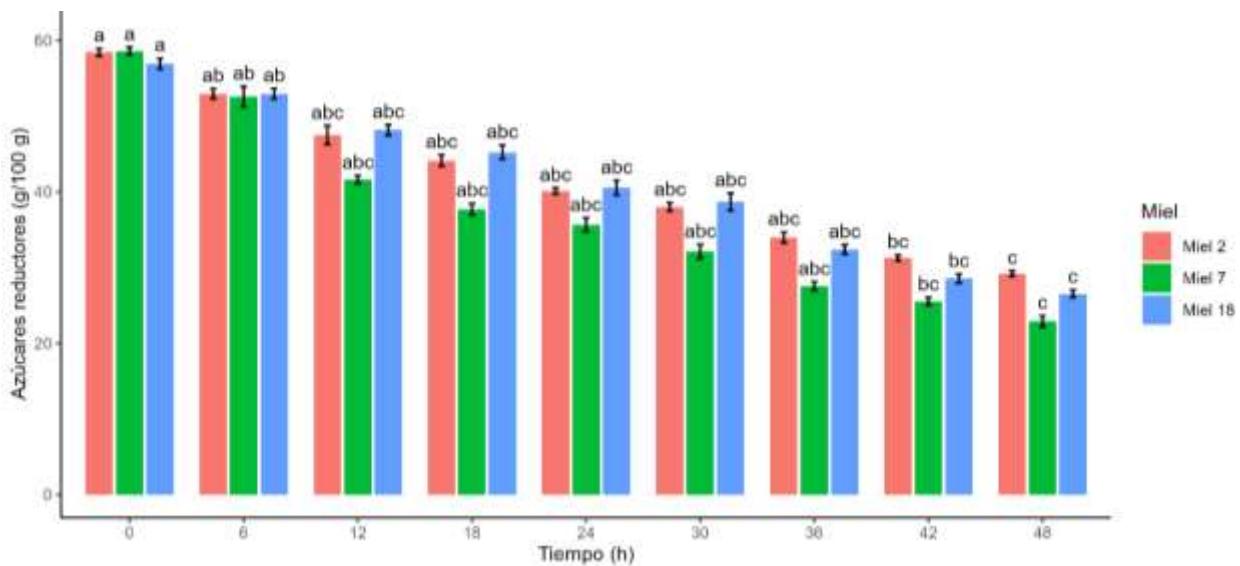


Figura 22. Cambios cinéticos en el contenido azúcares reductores durante la fermentación de las muestras (2, 7 y 18) evaluados de 0 a 48 h. Los valores corresponden a la media ± desviación estándar de tres repeticiones, letras diferentes indican diferencias significativas por miel (Dunn – Bonferroni, $p < 0.05$).

La Figura 22 muestra los cambios del contenido de azúcares reductores (g/ 100 g) durante 48 horas de fermentación en tres muestras de miel (2, 7 y 18). Los resultados se presentan como media ± desviación estándar. En general se observa una disminución progresiva del contenido de azúcares reductores a lo largo del proceso de fermentación, siendo más pronunciada a partir de las 12 – 24 h. La miel número 7 presentó consistentemente los valores más bajos hacia las etapas finales, mientras que la miel número 18 mantuvo concentraciones relativamente más altas en comparación con las otras mieles. Estos resultados sugieren un consumo diferencial de azúcares fermentables dependiente del tipo de miel. Esta reducción puede atribuirse al metabolismo de los azúcares por parte de *L. rhamnosus*, que es capaz de utilizar glucosa y fructosa como fuente de carbono y energía, ambos monosacáridos se encuentran presentes en la miel de *S. mexicana*. Las bacterias acido lácticas metabolizan estos azúcares a través de la vía glucolítica Embden – Meyerhof, en la cual los carbohidratos son transformados en productos como ácido láctico, así como en menores proporciones, ácido acético, etanol y

dióxido de carbono (Hutkins, 2018, de Melo *et al.*, 2020). La disminución de azúcares en la fermentación refleja la posible conversión en ácidos orgánicos y otros metabolitos secundarios, lo que contribuye no solo a la reducción en el contenido de carbohidratos sino también cambios en el pH, acidez y propiedades funcionales de la matriz fermentada (Gänzle, 2015).

Perez-Perez *et al.*, (2007) en su estudio reportaron que, durante el proceso de fermentación de la miel de *Tetragonisca angustula* el contenido de azúcares totales disminuyó de manera significativa, pasando de 81.5 a 31.7 g/100 g de miel. Estos resultados son congruentes con lo observado en esta investigación.

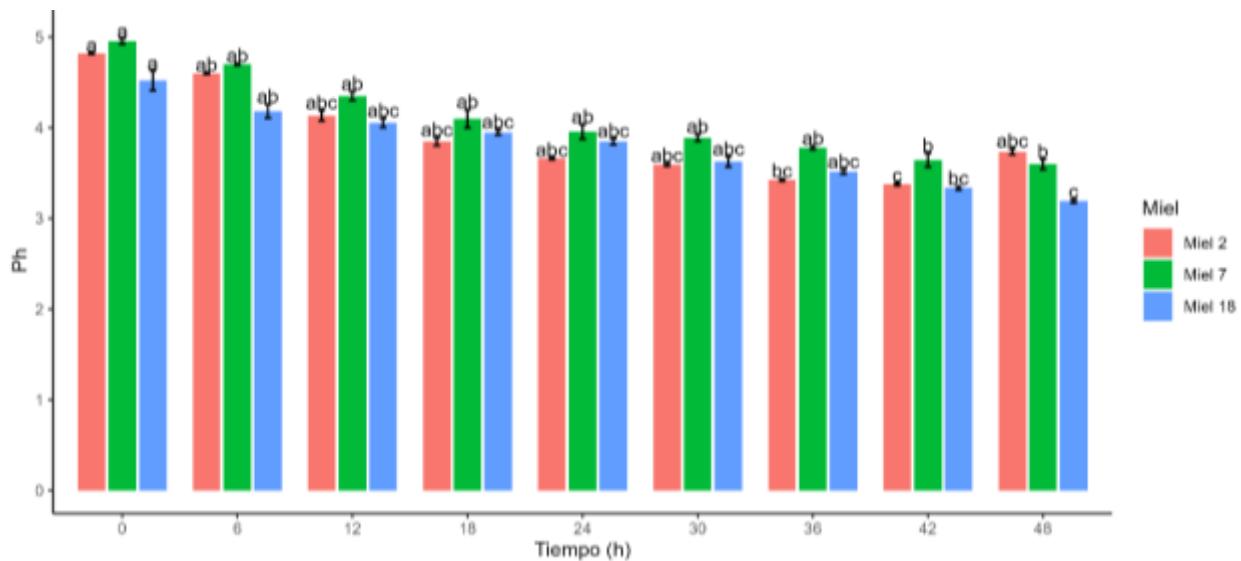


Figura 23. Cambios cinéticos en el pH durante la fermentación de las muestras (2, 7 y 18) evaluados de 0 a 48 h. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres repeticiones, letras diferentes indican diferencias significativas por miel (Dunn – Bonferroni, $p < 0.05$).

La Figura 23 muestra la evolución del pH durante 48 horas de fermentación en tres muestras de miel (2, 7 y 18). Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar. En la gráfica se observa una disminución progresiva del pH a lo largo del proceso de fermentación, siendo más pronunciada a partir de las 12 – 18 h. Estos resultados evidencian la acidificación del medio asociada a la actividad metabólica microbiana durante la fermentación con diferencias de acuerdo a la composición de cada miel. De Melo *et al.*, (2020) evaluaron la actividad prebiótica de la miel de *Melipona subnitida Ducke* y *Melipona scutellaris Latrelle* mediante la adición de *Lactobacillus*

acidophilus y *Bifidobacterium lactis*, reportaron una disminución de pH a las 48 horas del proceso de fermentación. Este comportamiento se asoció con la actividad metabólica de los microorganismos fermentadores y es congruentes con los resultados obtenidos del presente estudio. La acumulación de ácidos orgánicos conduce a un incremento de la acidez y consecuentemente a la reducción del pH. En este contexto los resultados del presente estudio respaldan la evidencia previa que señala a la fermentación como un proceso determinante en la transformación fisicoquímica en miel de abejas sin aguijón.

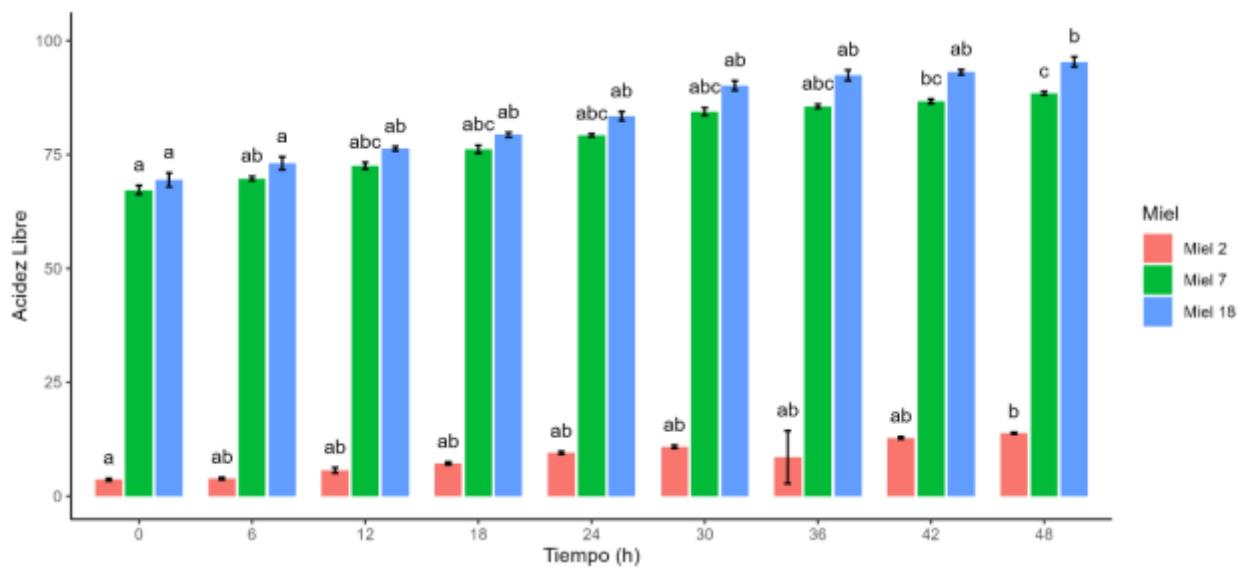


Figura 24. Cambios cinéticos de acidez libre durante la fermentación de las muestras (2, 7 y 18) evaluados de 0 a 48 h. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres repeticiones, letras diferentes indican diferencias significativas por miel (Dunn – Bonferroni, $p < 0.05$).

La Figura 23 muestra los cambios en la acidez libre durante 48 horas de fermentación en tres muestras de miel (2, 7 y 18). Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar. En la gráfica se observa un incremento de la acidez libre en todas las mieles conforme avanza la fermentación. La miel 18 registró los valores más elevados a lo largo del periodo experimental. Este comportamiento sugiere una producción gradual de ácidos orgánicos asociada a la actividad metabólica microbiana. El incremento de acidez está relacionada con el proceso de fermentación (de Melo et al., 2020)

7.6.2. Fenoles totales y Flavonoides

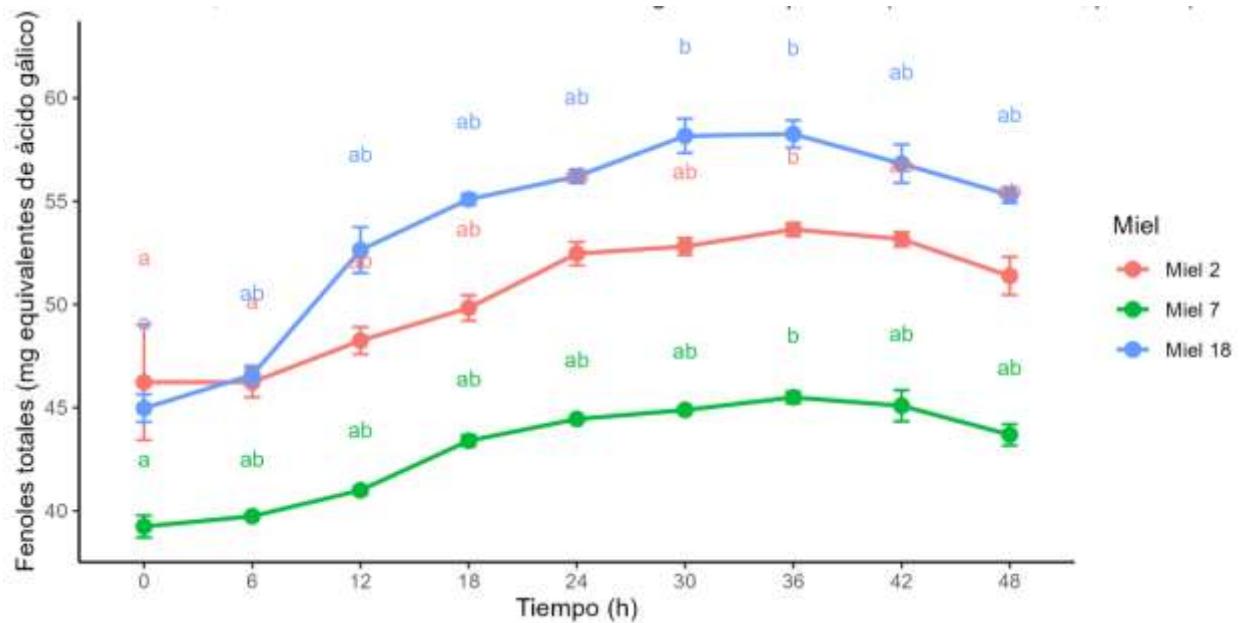


Figura 25. Cambios cinéticos en el contenido de Fenoles Totales expresado en mg equivalentes de ácido gálico durante la fermentación de las muestras (2, 7 y 18) evaluados de 0 a 48 h. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres repeticiones, letras diferentes indican diferencias significativas por miel (Dunn – Bonferroni, $p < 0.05$).

La Figura 25 muestra la evolución del contenido de compuestos fenólicos totales durante el proceso de fermentación, expresados como mg equivalentes de ácido gálico, a lo largo de un periodo de 48 h. Se evaluaron tres mieles de *S. mexicana* (Muestra 2, 7 y 18). Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar. En general, todas las muestras de miel mostraron un incremento progresivo en el contenido de fenoles totales durante las primeras etapas de la fermentación, seguido de una fase de estabilización o una ligera disminución hacia las 42-48 horas. La miel 18 presentó consistentemente los valores más elevados de compuestos fenólicos a lo largo del proceso, con un aumento significativo desde el tiempo inicial hasta alcanzar un máximo entre las 30 y 36 horas, seguido de una leve reducción final del periodo de fermentación. La miel 2 exhibió un comportamiento intermedio, caracterizado por un incremento gradual de fenoles totales hasta aproximadamente las 36 horas, tras lo cual se observó una ligera disminución. Por su parte la miel 7 mostró los valores más bajos de compuestos fenólicos durante todo el proceso; no obstante, también presentó un aumento sostenido durante la fermentación.

En conjunto los resultados indican que el proceso de fermentación favorece la liberación o transformación de compuestos fenólicos en las mieles evaluadas, aunque la magnitud de este efecto depende del tipo de miel, lo que sugiere diferencias asociadas a su composición inicial y a su respuesta bioquímica durante la fermentación.

El incremento de en el contenido de fenoles totales después de la fermentación puede explicarse desde un punto de vista mecanístico, por la conversión de fenoles ligados en fenoles libres inducida por la actividad enzimática de bacterias ácido lácticas. Durante la fermentación, *Lactobacillus spp.* Produce enzimas como β -glucosidasas, esterasas y fenol-ácido descarboxilasas, las cuales hidrolizan enlaces glicosídicos y ésteres que mantienen a los polifenoles unidos a la matriz del sustrato, liberándolos en su forma libre. Esta acción enzimática resulta en una elevación de los niveles de polifenoles (Zhang *et al.*, 2023). Los fenoles ligados, pueden estar presentes en la miel, sin embargo presentan una biodisponibilidad limitada debido a su baja accesibilidad intestinal. En contraste los fenoles libres exhiben una mayor solubilidad y capacidad de absorción en el tracto gastrointestinal, lo que incrementa su potencial bioactivo (Filannino *et al.*, 2018). En este contexto la fermentación no solo incrementa el contenido de fenoles totales, si no que también mejora su perfil funcional al favorecer formas químicas más biodisponibles.

Los resultados del presente estudio son congruentes con lo reportado por Razali *et al.* (2019) realizaron un estudio en el que evaluaron las propiedades prebióticas de la miel de abeja sin aguijón, con la adición de *L. acidophilus* y *L. brevis*, observando un incremento del contenido fenólico total en un 47,2%.

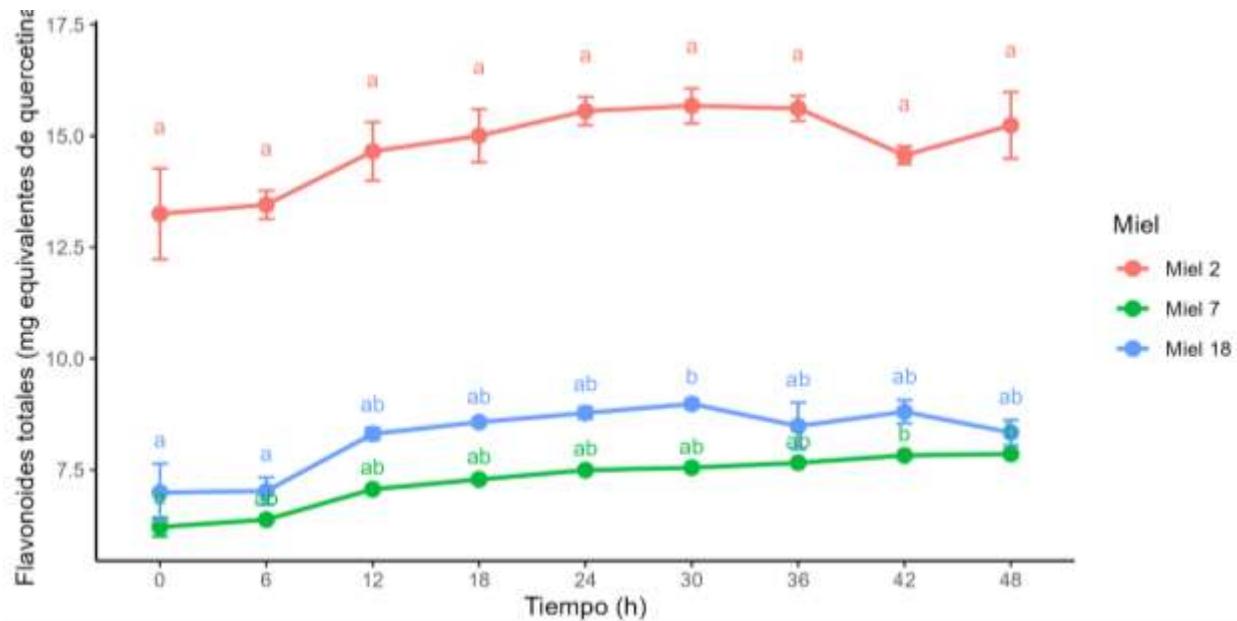


Figura 26. Cambios cinéticos en el contenido flavonoides totales expresados en mg equivalentes de quercentina durante la fermentación de las muestras (2, 7 y 18) evaluados de 0 a 48 h. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres repeticiones, letras diferentes indican diferencias significativas por miel (Dunn – Bonferroni, $p < 0.05$).

La Figura 26 muestra la evolución del contenido de flavonoides totales durante el proceso de fermentación, expresados como mg equivalentes de quercentina, a lo largo de un periodo de 48 h. Se evaluaron tres mieles de *S. mexicana* (Muestra 2, 7 y 18). Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar, y las diferencias estadísticas entre mieles para cada tiempo de muestreo se indican mediante letras disntintas, de acuerdo con la prueba no paramétrica de Dunn-Bonferroni ($p < 0.05$).

En general, las tres mieles exhibieron un incremento progresivo en el contenido de flavonoides durante las primeras etapas de la fermentación, seguido de una fase de estabilización y ligeras fluctuaciones hacia el final del periodo evaluado. La muestra número 2 presentó consistentemente los valores más elevados de flavonoides totales a lo largo de todo el proceso, con un aumento gradual desde el tiempo inical hasta alcanzar los valores máximos alrededor de las 24-36 h. La muestra número 18 mostró un comportamiento intermedio, caracterizado por un incremento sostenido del contenido de flavonoides hasta aproximadamente las 30 h. Por su parte, la Miel número 7 presentó los valores más bajos de flavonoides totales durante todo el proceso. En conjunto los

resultados indican que el proceso de fermentación favorece la libreción o transformación de flavonoides en las mieles evaluadas, aunque el efecto depende del tipo de miel, lo que sugiere diferencias asociadas a su composición inicial.

Diversas vías metabólicas, como la metilación, la glicosilación y la esterificación de glicoles, entre otras, podrían contribuir a la acumulación de polifenoles durante los procesos de fermentación microbiana (Jamal *et al.*, 2011). Dichas transformaciones están asociadas con la capacidad de algunos microorganismos para modificar la estructura química de los compuestos fenólicos presentes en la matriz alimentaria.

Múltiples microorganismos han demostrado la capacidad de biotransformar glicósidos flavonoides mediante diferentes reacciones enzimáticas como desglicosilación, procesos que incrementa la biodisponibilidad de los flavonoides al liberar la fracción aglicona de los azúcares unidos (Cao *et al.*, 2015). La desglicosilación de flavonoides se ha atribuido principalmente a la actividad de enzimas β -glucosidasas, las cuales han sido reportadas en diversas cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) (Di Gioia *et al.*, 2014). De Melo *et al.*, (2020) reportaron que la β -glucosidasa se producía durante la fermentación de *L. rhamnosus*. Evidencia experimental que respalda este mecanismo fue reportada por Nutter *et al.*, (2016), quienes observaron un incremento del 30% en la fracción total de flavonoides después de 19 h de incubación con *L. fermentum*. Estos hallazgos concuerdan con el aumento de flavonoides observado en el presente estudio.

7.6.3. Actividad antioxidante

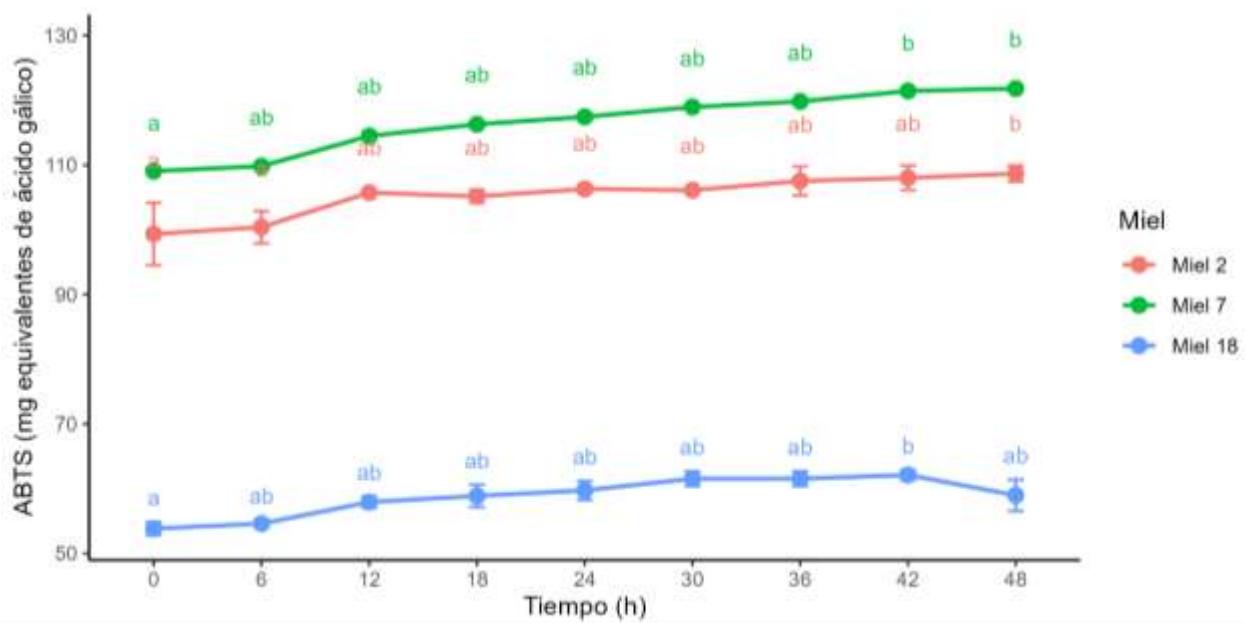


Figura 27. Cambios cinéticos en la actividad antioxidante por el método de ABTS expresados en mg equivalentes de ácido gálico durante la fermentación de las muestras (2, 7 y 18) evaluados de 0 a 48 h. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de tres repeticiones, letras diferentes indican diferencias significativas por miel (Dunn – Bonferroni, $p < 0.05$).

La Figura 27 muestra los cambios cinéticos de la actividad antioxidante determinada por el método ABTS durante el proceso de fermentación, expresada como mg equivalentes de ácido gálico, a lo largo de un periodo de 48 h. Se evaluaron tres mieles de *S. mexicana* (Muestra 2, 7 y 18). Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar, y las diferencias estadísticas entre mieles para cada tiempo de muestreo se indican mediante letras distintas, de acuerdo con la prueba no paramétrica de Dunn-Bonferroni ($p < 0.05$). En general, las tres mieles mostraron un incremento progresivo de la actividad antioxidante en el proceso de fermentación controlada, con magnitudes claramente diferenciadas entre tratamientos. La muestra número 2 presentó consistentemente valores más elevados de capacidad antioxidante durante todo el periodo evaluado, con un aumento sostenido desde el tiempo inicial hasta alcanzar los valores máximos a las 42-48 h. La Miel número 2 exhibió un comportamiento intermedio, caracterizado por un incremento gradual de la actividad antioxidante a lo largo de la fermentación. La miel

número 18 presentó los valores más bajos de actividad antioxidante, entre las mieles evaluadas; no obstante, también mostró un incremento progresivo hasta aproximadamente 30-42 h. En conjunto los resultados indican que la fermentación favorece el aumento de la capacidad antioxidante de las mieles evaluadas.

La actividad antioxidante observada se encuentra estrechamente relacionada con el incremento en el contenido de polifenoles, particularmente de ácidos fenólicos como el ácido gálico, ácido clorogénico, ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico, los cuales han sido ampliamente reconocidos por su elevada capacidad para neutralizar especies reactivas de oxígeno mediante mecanismos de donación de electrones e hidrógeno (Zapata-Bustamante *et al.*, 2013). En este sentido Perez-Perez *et al.*, (2007) evaluaron la evolución de la actividad antioxidante durante la fermentación de la miel de *Tetragonisca angustula* y reportaron un incremento progresivo, evidenciando por un aumento en la inhibición del anión superóxido de 69.1% a 94.8% y del radical hidroxilo de 62.2% a 90.5%. Estos resultados son congruentes con los hallazgos obtenidos en el presente estudio.

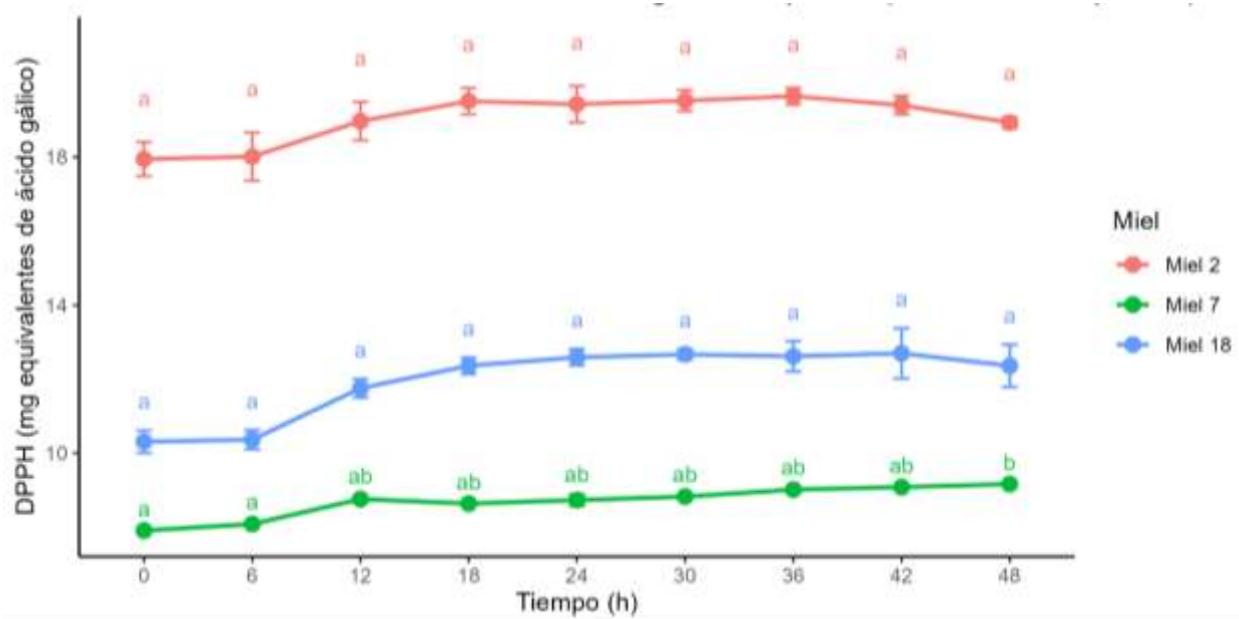


Figura 28. Cambios cinéticos en la actividad antioxidante por el método de DPPH expresados en mg equivalentes de ácido gálico durante la fermentación de las muestras (2, 7 y 18) evaluados de 0 a 48 h. Los valores corresponden a la media ± desviación estándar de tres repeticiones, letras diferentes indican diferencias significativas por miel (Dunn – Bonferroni, $p < 0.05$)

La Figura 28 muestra los cambios cinéticos de la actividad antioxidante determinada por el método DPPH durante el proceso de fermentación, expresada como mg equivalentes de ácido gálico, a lo largo de un periodo de 48 h. Se evaluaron tres mieles de *S. mexicana* (Muestra 2, 7 y 18). Los resultados se presentan como media ± desviación estándar, y las diferencias estadísticas entre mieles para cada tiempo de muestreo se indican mediante letras distintas, de acuerdo con la prueba no paramétrica de Dunn-Bonferroni ($p < 0.05$). En general, las tres mieles mostraron un incremento progresivo en la actividad antioxidante medida por DPPH. La muestra número 2 presentó consistentemente los valores más elevados de actividad antioxidante durante todo el periodo evaluado, seguida por la miel 18, mientras que la miel 7 mostró valores más bajos. En conjunto los resultados indican que la fermentación induce cambios en la capacidad antioxidante medida por DPPH, cuya magnitud depende de las características de la miel.

Asimismo, la liberación de fenoles libres se asocia directamente con un aumento en la actividad antioxidante, ya que estos compuestos poseen una mayor capacidad para donar electrones o átomos de hidrógeno y neutralizar especies reactivas de oxígeno en comparación con sus formas ligadas (Landete, 2017). Estudios previos han demostrado que este fenómeno se traduce en mejoras significativas en ensayos antioxidantes como DPPH y ABTS tras procesos de fermentación (Filannino et al., 2018).

7.7. Actividades biológicas

7.7.1. Ensayo *in vitro* de inhibición de α -amilasa

En el presente estudio, la adición del extracto acuoso de miel de *S. mexicana* redujo significativamente la actividad de la α -amilasa ($p < 0.05$). Las muestras de miel seleccionadas correspondían a la región que presentaba un alto contenido en compuestos fenólicos. Las muestras arbóreas de miel de *S. mexicana* de Cruz Blanca mostraron actividad antidiabética con el ensayo de inhibición de la α -amilasa a

concentraciones comprendidas entre 20 y 100 µg/ml. La descomposición del enlace α -(1-4) y, por tanto, la producción de glucosa se vieron ralentizada. Según los resultados obtenidos en la figura 20, el porcentaje de inhibición de la α -amilasa aumentó al aumentar las concentraciones de las muestras de miel. El tamaño del efecto fue grande en las tres muestras ($\eta^2 > 0.9$), lo que significa que >90% de la variabilidad en la inhibición de la enzima se debió a la concentración del extracto. A una concentración de 100 µg/mL, la mayor actividad se observó en la miel de Cruz blanca (23 C) (49.20 % \pm 2,74), seguida de la muestra de miel 16 C (34.04 % \pm 2,12) y, por último, la muestra de miel 15 C (23.89 % \pm 1.08) (Figura 20). La inhibición de las mieles de *S.mexicana* fue menor en comparación con el control positivo, la acarbosa. Los resultados de la inhibición fueron similares al estudio realizado por Ali et al., (2020) en este estudio el porcentaje de inhibición con la miel de *H. itama* fue del 466 % con respecto a la miel multifloral. Se informó de que los compuestos fenólicos eran los responsables de la actividad antidiabética (Zakaria et al., 2020). Esto podría ser un enfoque eficaz para controlar la diabetes es inhibir fuertemente la actividad intestinal de la actividad de la α -amilasa (Sabiu et al., 2016). Algunos fármacos hipoglucemiantes orales reducen la hiperglucemia postprandial suprimiendo la hidrólisis de los hidratos de carbono, se revelan útiles en los controles postprandiales de los niveles plasmáticos de glucosa (Kotowaroo et al., 2006). Sin embargo los fármacos convencionales presentan efectos secundarios indeseables, en este sentido las fuentes naturales son mejores para el efecto inhibitorio. Los extractos de miel de *S.mexicana* pueden ser útiles para disminuir los niveles séricos de glucosa en sangre mediante la inhibición de la actividad de la α -amilasa en plasma.

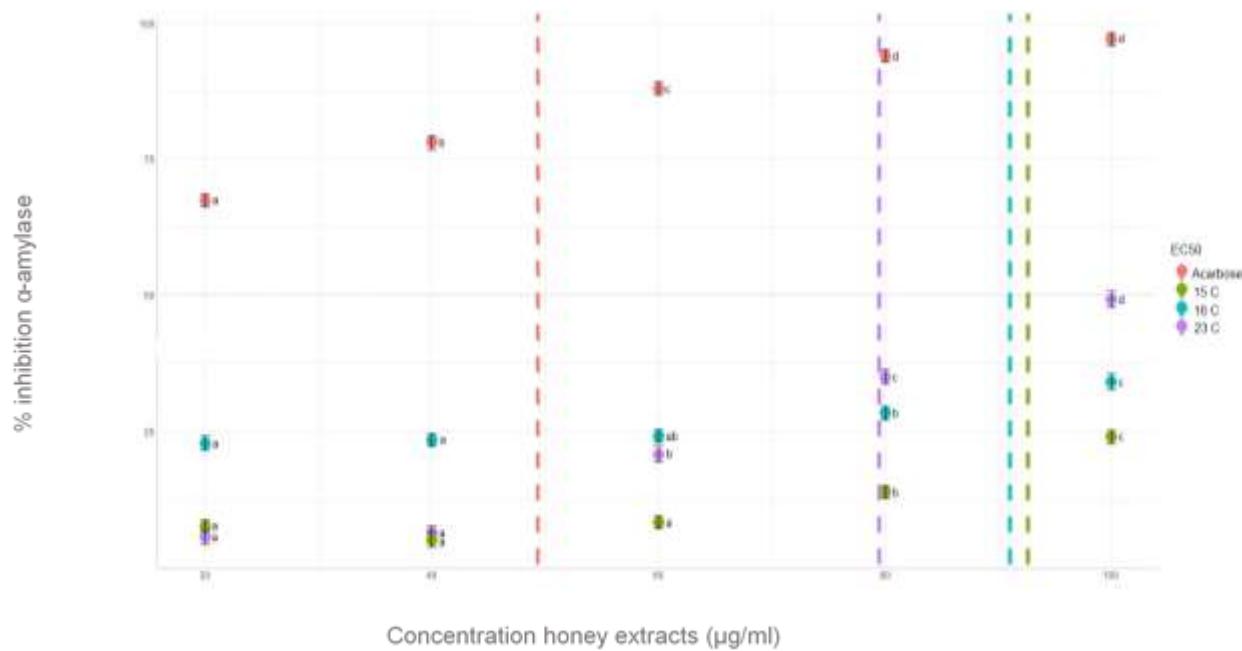
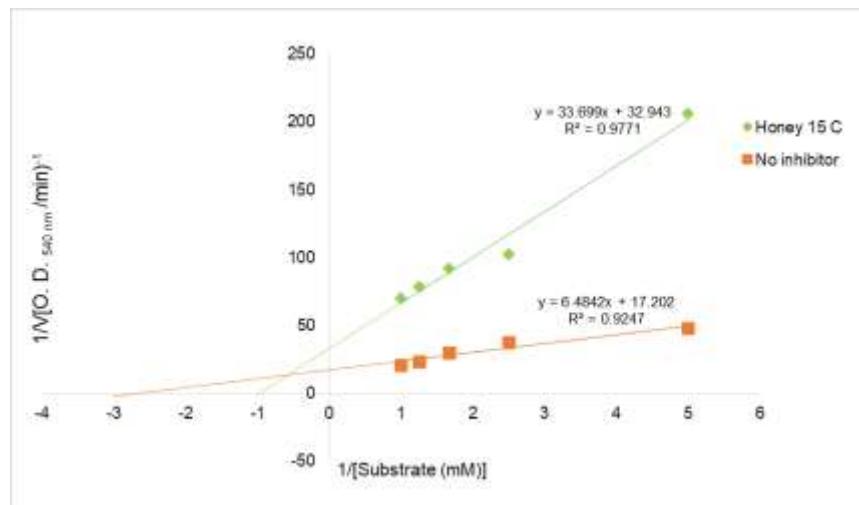


Figura 29. Efectos de concentraciones graduadas de extractos de acuosos de miel de abeja sin aguijón de Cruz Blanca sobre la inhibición de la α -amilasa *in vitro*. Cada punto representa la inhibición enzimática media y las líneas verticales muestran el valor EC 50. Las letras distintas mostraron diferencias estáticas entre las distintas concentraciones en las muestras de la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

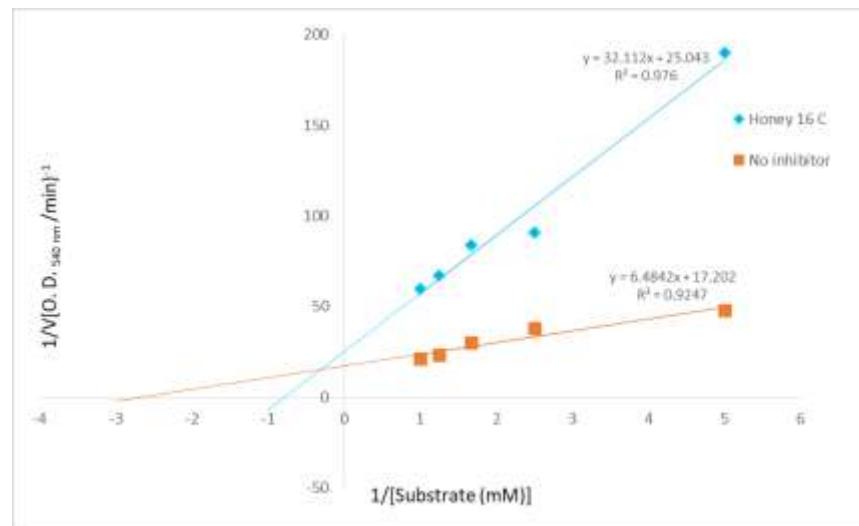
7.7.2. Cinética de inhibición de la α -amilasa.

La cinética de inhibición de la α -amilasa se realizó además mediante gráficas de Lineweaver-Burk. Muestras de miel de distintos orígenes regionales. El resultado mostró que todas las muestras (15 C, 16 C y 23 C) presentaban una inhibición mixta no competitiva que proporcionaba una disminución de la V_{max} y la K_m en comparación con las del control (Tabla 10 y Figura 19). Esto significa que los inhibidores en las muestras de miel de *S. mexicana* se unieron cerca del sitio activo. Los diferentes valores de $V_{máx}$ y K_m pueden deberse a la presencia de diferentes compuestos bioactivos en las muestras.

A)



B)



C)

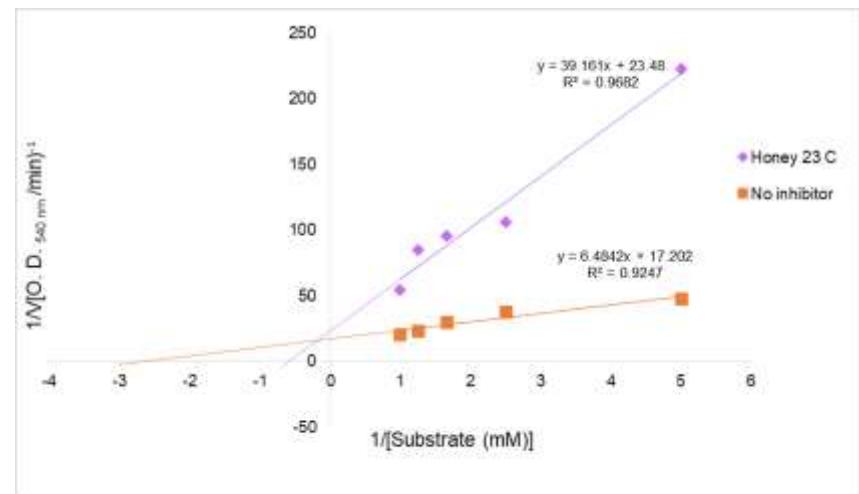


Figura 30. Cinética de inhibición de la α -amilasa. A). Diagrama de Lineweaver-Burk, muestra 15 C. B). Gráfico de Lineweaver-Burk, muestra 16 C y C). Gráfico de Lineweaver-Burk muestra 23C.

Tabla 10. Cinéticas de inhibición de la enzima α -amilasa con extractos de miel de *Scaptotrigona mexicana*

Muestra	Ecuación	Vmax (D.O. 540/min)	Km (mM)	Tipo de inhibición
Control	$y = 6.4842x + 17.202$	0.058	0.37	Sin inhibidor
Miel 15 C	$y = 33.699x + 32.943$	0.030	1.02	Inhibición no competitiva mixta
Miel 16 C	$y = 32.112x + 25.043$	0.039	1.28	Inhibición no competitiva mixta
Miel 23 C	$y = 39.161x + 23.48$	0.042	1.66	Inhibición no competitiva mixta

7.7.3. Inhibición de la ureasa

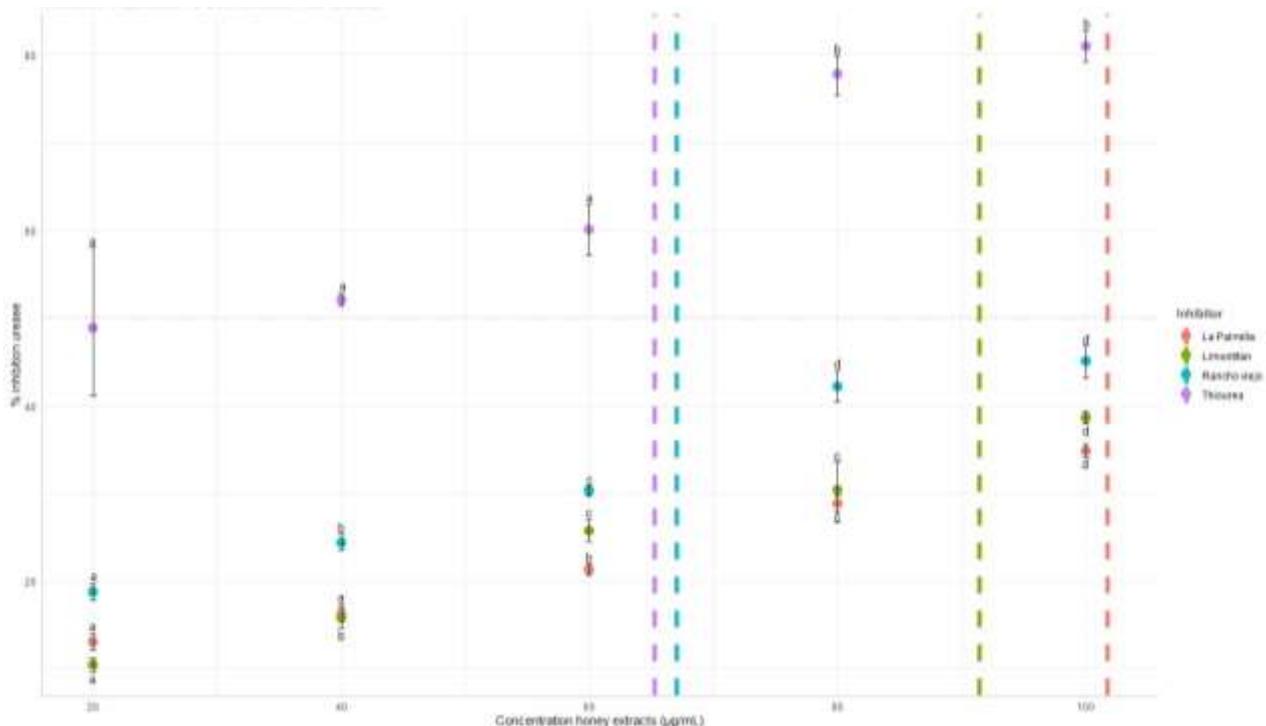


Figura 31. Efectos de concentraciones graduadas de extractos de acuoso de miel de abeja sin aguijón de 3 regiones distintas sobre la inhibición de la ureasa *in vitro*. Cada punto representa la

inhibición enzimática media y las líneas verticales muestran el valor EC 50. Las letras distintas mostraron diferencias estáticas entre las distintas concentraciones en las muestras de la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

En el presente estudio se evaluó la capacidad inhibitoria de extractos acuosos de miel de *S. mexicana* sobre la enzima ureasa ($p < 0,05$). Las mieles analizadas, de origen multifloral, procedieron de las regiones de La Palmilla, Limontitán y Rancho Viejo. Todas las muestras mostraron actividad inhibitoria frente a la ureasa en todas las concentraciones evaluadas (20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g/ml}$). Se observó un incremento progresivo en el porcentaje de inhibición conforme aumento la concentración del extracto, evidenciando un efecto dependiente de la dosis. El tamaño del efecto fue grande en las tres muestras, con valores de $\eta^2 = 0.97$ para la muestra de La Palmilla, $\eta^2 = 0.98$ para la región de Limontitán y $\eta^2 = 0.98$ para Rancho Viejo lo que indica que más del 95% de la variabilidad en la inhibición de la enzima se atribuye a la concentración del extracto. A la concentración más alta (100 $\mu\text{g/mL}$) la mayor inhibición de la ureasa se registró con la miel de Rancho Viejo (45.10 % \pm 2.7), seguida por la muestra de Limontitán (38.57 % \pm 0.91) y finalmente el de la Palmilla (34.82 % \pm 1.54). Sin embargo, la inhibición observada en todas las mieles fue inferior a la del control positivo con tiourea, un conocido inhibidor de la ureasa.

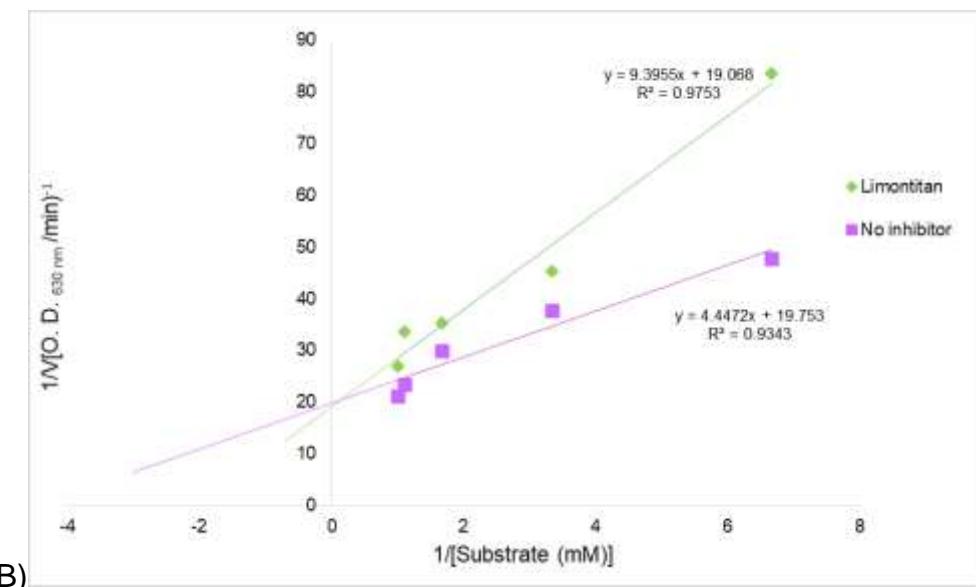
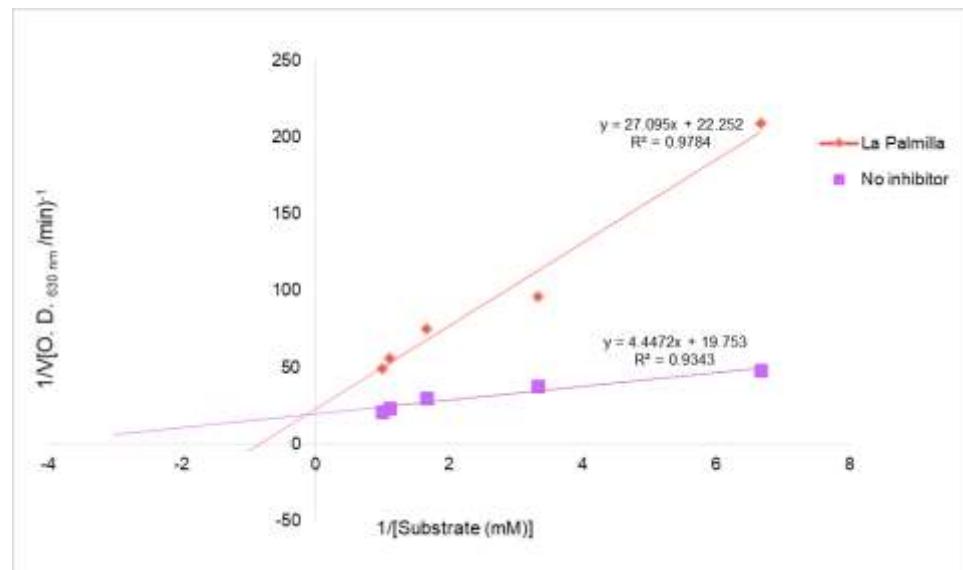
La bioactividad observada en las mieles puede atribuirse a la presencia de metabolitos secundarios derivados de las fuentes florales visitadas por las abejas, entre los que destacan los ácidos fenólicos y flavonoides compuestos asociados con la inhibición enzimática (Sahin 2016; Rückriemen et al., 2017). La ureasa producida por *H. pylori* cataliza la hidrólisis de la urea para generar amoniaco, que neutraliza el ácido clorhídrico gástrico y favorece el crecimiento de la bacteria, por lo que la inhibición de la ureasa, reduce la viabilidad del microorganismo (Voidarou et al., 2021). De acuerdo con Muhammad et al., (2012) la capacidad inhibitoria de los flavonoides podría estar relacionada con la presencia de grupos hidroxilo (-OH) capaces de quelarse con los átomos de níquel (Ni) en el sitio activo de la ureasa. Los compuestos con mayor cantidad de grupos hidroxilo (tres o cuatro) muestra una inhibición más grande, mientras que su disminución se asocia con una reducción en la actividad inhibitoria (Khan et al., 2012). Henríquez et al., (2014) sugieren que los compuestos con alta potencia inhibidora pueden interactuar mediante puentes de hidrógeno. Mientras Uddin et al., (2016). Señala que los

residuos hidroxilo (-OH) en el anillo C de los flavonoides, permiten interacciones con los residuos próximos a los átomos de níquel del sitio activo de la ureasa de manera similar a la que interactúa la tiourea. Resultados similares fueron reportados por Rückriemen et al., (2017) quienes evaluaron la inhibición de la enzima ureasa utilizando miel de Manuka y observaron un aumento de la inhibición conforme incrementó la concentración de extracto. En su estudio la miel de rapé, mostró una inhibición del 34 %, en la miel de lima, del 43 % y la miel de Manuka presentó mayor inhibición alcanzando un 62 %. Estos hallazgos coinciden con los del presnete estudio, en donde también se observó un efecto dosis –dependiente.

7.7.4. Cinética de inhibición de la ureasa.

La cinética de inhibición de la ureasa con la adiciones de mieles de origen multifloral de la región de la La Palmilla, Limontitán y Rancho Viejo se analizaron mediante gráficas de Lineweaver-Burk. Los resultados indicaron que las muestras de la región de La Palimilla y Rancho viejo presentaron una inhibición mixta no competitiva con una disminución de la Vmax y la Km en comparación con las del control (Tabla 11 y Figura 23). Esto significa que los inhibidores en las muestras de miel de *S. mexicana* se unieron cerca del sitio activo. Los diferentes valores de Vmáx y Km pueden deberse a la presencia de diferentes compuestos bioactivos en las muestras. Mientras que la muestra de Limontitán mostró una inhibición competitiva.

A)



B)

C)

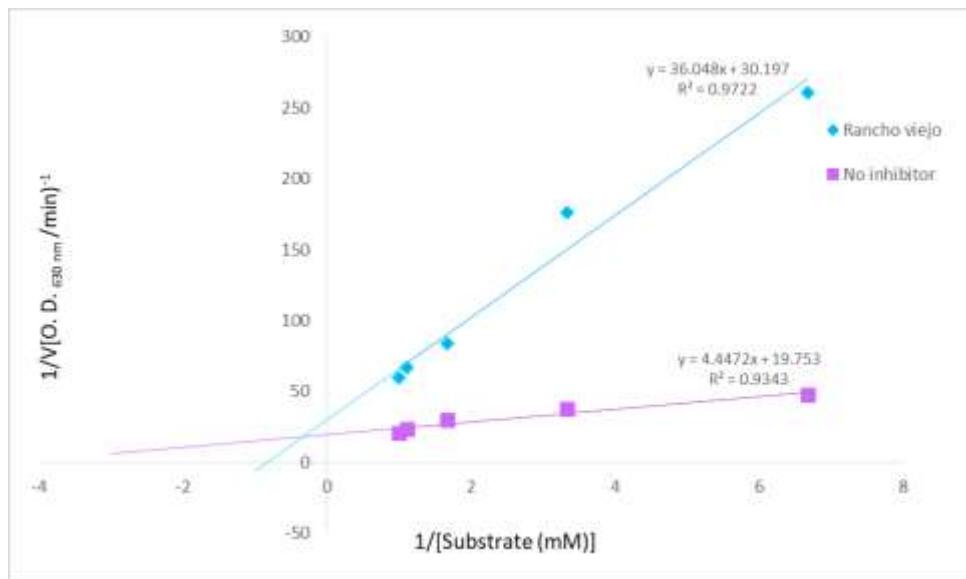


Figura 32. Cinética de inhibición de la ureasa. A). Diagrama de Lineweaver-Burk, muestra La Palmilla. B). Gráfico de Lineweaver-Burk, muestra Limontitán y C). Gráfico de Lineweaver-Burk muestra Rancho Viejo.

Tabla 11. Cinéticas de inhibición de la enzima ureasa con extractos de miel de *Scaptotrigona mexicana*

Muestra	Ecuación	m	B	Vmax	Km	Tipo de inhibición
Control	$y=4.4472x+19.753$	4.45	19.75	0.05	0.23	sin inhibición
La Palmilla	$y=27.095x + 22.252$	27.10	22.25	0.04	1.22	Inhibición competitiva mixta
Limontitán	$y=9.3955x+19.068$	9.40	19.07	0.05	0.49	Inhibición competitiva
Rancho Viejo	$y=36.048x + 30.197$	36.05	30.20	0.03	1.19	Inhibición competitiva mixta

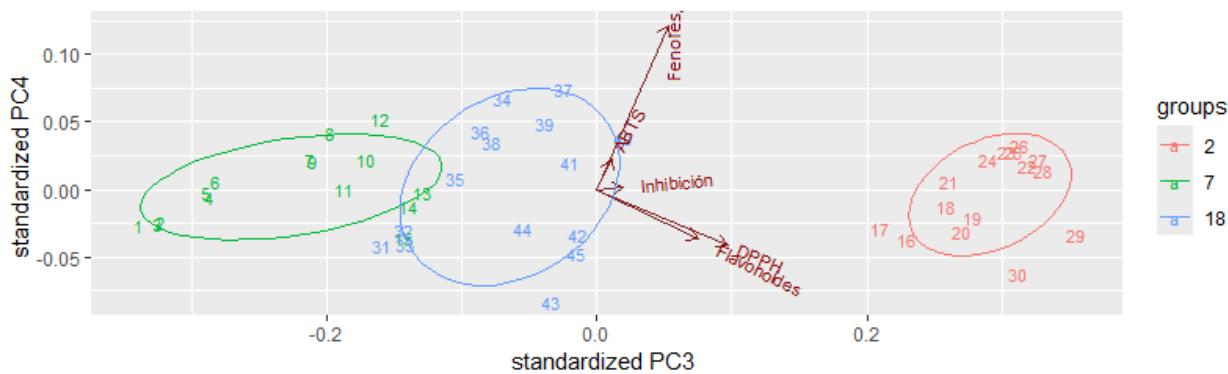


Figura 33. Análisis multivariado (PCA) de los parámetros bioactivos después de 48 horas de fermentación controlada.

La Figura 24 Muestra el análisis de componentes principales (PCA) correspondientes a las muestras de miel sometidas a un proceso de fermentación controlada durante 48h evaluadas en función del contenido de fenoles totales, flavonoides totales, actividad antioxidante determinada por los métodos DPPH y ABTS y la inhibición enzimática de la ureasa. Los dos componentes representados (PC3 y PC4) explicaron una proporción significativa de la varianza total del sistema y permitieron evidenciar una clara diferenciación entre las muestras fermentadas. Los vectores de las variables muestran que los fenoles totales y ABTS se proyectaron en direcciones similares, indicando una correlación positiva entre el contenido fenólico total y la capacidad antioxidante medida por este método. De manera similar los flavonoides y DPPH se asociaron estrechamente, lo que sugiere que los flavonoides contribuyeron de manera importante a la neutralización del radical DPPH. Por su parte, la inhibición enzimática se orientó en dirección intermedia lo que indica que la actividad inhibitoria de la ureasa podría estar relacionada con la presencia de flavonoides y la capacidad antioxidante de las mieles fermentadas. La miel de la región de La Palmilla (en color rojo) se ubicó en la región positiva del PC3, coincidiendo con las direcciones de las variables bioactivas. Este grupo se caracterizó por presentar los valores más altos de fenoles totales, flavonoides, actividad antioxidante e inhibición de la ureasa, lo que sugiere que la fermentación promovió la liberación o biotransformación de compuestos fenólicos que incrementaron el potencial funcional de esta miel. En contraste, el grupo de Limontitan (color verde, localizado en el grupo 7) se asoció con menores concentraciones de compuestos fenólicos y una reducida capacidad antioxidante e inhibitoria. Estas muestras podrían

corresponder a mieles cuya fermentación fue menos activa o en las que se produjeron pérdidas de metabolitos antioxidantes. Por su parte, la miel de Rancho viejo se posicionó en una región intermedia, mostrando valores moderados de las variables analizadas, lo que podría indicar un efecto fermentativo parcial. Estos resultados evidencian que la fermentación con *Lactobacillus rhamnosus* modificó significativamente el perfil químico funcional de la miel, generando grupos diferenciados según su respuesta bioquímica. La asociación positiva entre el contenido fenólico, la actividad antioxidante y la inhibición de la ureasa confirma la interrelación metabólica entre los compuestos antioxidantes y los mecanismos enzimáticos de defensa. Diversos autores han reportado que los procesos fermentativos pueden incrementar el contenido de metabolitos fenólicos debido a la acción enzimática de los microorganismos, que hidrolizan compuestos conjugados o liberan agliconas con mayor actividad biológica (Yang et al., 2023; Song et al., 2024). Los microorganismos son capaces de incrementar la bioactividad fenólica debido a la biotransformación que sucede en el proceso de fermentación (Khosravi y Razavi, 2021). En este sentido, los resultados sugieren que la miel de *S. mexicana* fermentada con *L. rhamnosus* podría ser una fuente potencial de compuestos bioactivos con efecto antioxidante e inhibitorio de la ureasa, relevantes para el desarrollo de alimentos funcionales y nutracéuticos.

8. CONCLUSIÓN

La revisión analítica evaluó el contenido de compuestos fenólicos (fenoles y flavonoides), la actividad antioxidante (ensayos DPPH y FRAP) y la composición fisicoquímica de la miel considerando parámetros como humedad, HMF, acidez libre, color y proteína, en mieles producidas por *A. mellifera* y nueve géneros de abejas sin aguijón. Los resultados evidenciaron que la especie de abeja influye en la composición fisicoquímica y fenólica de la miel; no obstante la magnitud de estas diferencias depende principalmente de factores ambientales como la latitud, la fuente floral (polifloral y monofloral) y el género de la abeja productora.

En este contexto la presente investigación destacó la necesidad de profundizaren el estudio de las mieles de abejas sin aguijón, ya que se observó que las propiedades fisicoquímicas de la miel de *S. mexicana* difieren de los parámetros establecidos para la miel de *A. mellifera*. En particular, se identificaron variaciones en parámetros como la humedad, la acidez libre, la actividad diastásica, el pH y el HMF.

Los resultados en este estudio pueden servir como base de datos de referencia para el desarrollo de criterios técnicos y regulatorios para miel de abejas sin aguijón. Se reconoce la necesidad de continuar generando evidencia científica que contribuya tanto al establecimiento de normativas adecuadas como a la preservación y fortalecimiento de la meliponicultura como fuente de productos benéficos para la salud humana, el cuidado ecológico y el impacto social.

Adicionalmente se demostró que la miel de *S. mexicana* puede funcionar como un sustrato adecuado para el crecimiento del probiótico *L. rhamnosus*, potenciando sus propiedades funcionales, posicionándola como un ingrediente con alto potencial nutracéutico. En conjunto, los resultados confirman que la fermentación láctica de miel de abejas sin aguijón promueve transformaciones metabólicas relevantes, caracterizadas por la utilización de azúcares fermentables por bacterias ácido lácticas y la consecuente producción de ácidos orgánicos, lo cual se refleja en la disminución del pH y el incremento de acidez del sistema. De manera paralela este proceso favorece la liberación y biotransformación de compuestos fenólicos y flavonoides hacia formas más biodisponibles, asociándose con un aumento en la actividad antioxidante.

Finalmente, los compuestos fenólicos presentes en la miel de *S. mexicana* mostraron potencial inhibitorio frente a enzimas como la α -amilasa y la ureasa, las cuales desempeñan un papel clave en la regulación de glucosa en sangre y en la protección gastrointestinal, respectivamente. Estos hallazgos refuerzan el valor funcional de la miel de *S. mexicana* y respaldan su aplicación como alimento funcional y nutracéutico.

9. RERENCIAS

1. Abd Jalil, M. A., Kasmuri, A. R., & Hadi, H. (2017). Stingless bee honey, the natural wound healer: A review. *Skin Pharmacology and Physiology*, 30(2), 66-75. <https://doi.org/10.1159/000458416>
2. Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology advances*, 31(6), 877-902. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002>
3. Abu, B. M., Sanusi, S. B., Abu, B. F., Cong, O. J., & Mian, Z. (2017). Physicochemical and antioxidant potential of raw unprocessed honey from Malaysian stingless bee. *Pakistan Journal of Nutrition*, 16(11), 888-894. doi: 10.3923/pjn.2017.888.894
4. Ahmad, F., Seerangan, P., Mustafa, M. Z., Osman, Z. F., Abdullah, J. M., & Idris, Z. (2019). Anti-cancer properties of *Heterotrigona itama* sp. honey via induction of apoptosis in malignant glioma cells. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 26(2), 30. doi:10.21315/mjms2019.26.2.4
5. Ali, H.; Abu Bakar, M.F.; Majid, M.; Muhammad, N.; Lim, S.Y. (2020). In Vitro Anti-Diabetic Activity of Stingless Bee Honey from Different Botanical Origins. *Food Res.*, 4, 1421–1426. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.4\(5\).411](https://doi.org/10.26656/fr.2017.4(5).411)
6. Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., Brenciani, A., Mazzoni, L., Gasparrini, M., González-Paramás, A. M., & Battino, M. (2018). *Apis mellifera* vs *Melipona beecheii* Cuban polifloral honeys: A comparison based on their physicochemical parameters, chemical composition and biological properties. *Lwt*, 87, 272-279. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.079>
7. Alves, A., Ramos, A., Gonçalves, M. M., Bernardo, M., & Mendes, B. (2013). Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30(2), 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.02.009>
8. Al-Waili, N. S., Saloom, K. Y., Al-Waili, T. N., Al-Waili, A. N., Akmal, M., Al-Waili, F. S., & Al-Waili, H. N. (2006). Influence of various diet regimens on deterioration of hepatic function and hematological parameters following carbon tetrachloride: a potential protective role of natural honey. *Natural Product Research*, 20(13), 1258-1264.

9. Appuhamy, J. R. N., Strathe, A. B., Jayasundara, S., Wagner-Riddle, C., Dijkstra, J., France, J., & Kebreab, E. (2013). Anti-methanogenic effects of monensin in dairy and beef cattle: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 96(8), 5161-5173. doi: 10.3168/jds.2012-5923
10. Ávila, S., Beux, M. R., Ribani, R. H., & Zambiazi, R. C. (2018). Stingless bee honey: Quality parameters, bioactive compounds, health-promotion properties and modification detection strategies. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 37-50. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.002>
11. Ávila, S., Beux, M. R., Ribani, R. H., & Zambiazi, R. C. (2018). Stingless bee honey: Quality parameters, bioactive compounds, health-promotion properties and modification detection strategies. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 37-50.
12. Balduzzi, S., Rücker, G., & Schwarzer, G. (2019). How to perform a meta-analysis with R: a practical tutorial. *BMJ Mental Health*, 22(4). <https://doi.org/10.1136/ebmental-2019-300117>
13. Ballesteros Pomar, M. D., & González Arnaiz, E. (2018). Papel de los prebióticos y los probióticos en la funcionalidad de la microbiota del paciente con nutrición enteral. *Nutrición hospitalaria*, 35(SPE2), 18-26.
14. Begg, C. B., & Mazumdar, M. (1994). Operating characteristics of a rank correlation test for publication bias. *Biometrics*, 1088-1101. <https://doi.org/10.2307/2533446>
15. Bertoncelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M., & Golob, T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 105(2), 822-828.
16. Bertsch, A. (1983). Nectar production of *Epilobium angustifolium* L. at different air humidities; nectar sugar in individual flowers and the optimal foraging theory. *Oecologia*, 59(1), 40-48. <https://doi.org/10.1007/BF00388069>
17. Biluca, F. C., Braghini, F., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (Meliponinae). *Journal of Food Composition and Analysis*, 50, 61-69. doi: 10.1016/j.jfca.2016.05.007
18. Biluca, F. C., da Silva, B., Caon, T., Mohr, E. T. B., Vieira, G. N., Gonzaga, L. V., ... & Costa, A. C. O. (2020). Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-

- inflammatory activities in stingless bee honey (Meliponinae). *Food Research International*, 129, 108756. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108756>
19. Biluca, F. C., Della Betta, F., de Oliveira, G. P., Pereira, L. M., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2014). 5-HMF and carbohydrates content in stingless bee honey by CE before and after thermal treatment. *Food Chemistry*, 159, 244-249.
20. Borba, R. S., Klyczek, K. K., Mogen, K. L., & Spivak, M. (2015). Seasonal benefits of a natural propolis envelope to honey bee immunity and colony health. *Journal of Experimental Biology*, 218(22), 3689-3699. doi: 10.1242/jeb.127324
21. Cao, H., Chen, X., Jassbi, A. R., & Xiao, J. (2015). Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. *Biotechnology Advances*, 33(1), 214-223. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.012>
22. Capurso, L. (2019). Thirty years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: a review. *Journal of clinical gastroenterology*, 53, S1-S41.
23. Carranza-Volquarts, A. E., Martínez-Negrete-Vera, A., & Vergara-Rodríguez, P. C. (2018). Análisis, simulación e implementación de modelos de crecimiento microbiano para la obtención de *Lactobacillus Plantarum*, *Lactobacillus Rhamnosus* y *Saccharomyces Boulardii* en un biorreactor multicultivo tipo lote alimentado.
24. Castañeda Guillot, C. (2018). Probióticos, puesta al día: an update. *Revista Cubana de Pediatría*, 90(2), 286-298.
25. Cavazza, A., Corradini, C., Musci, M., & Salvadeo, P. (2013). High-performance liquid chromatographic phenolic compound fingerprint for authenticity assessment of honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(5), 1169-1175. doi: 10.1002/jsfa.5869
26. Cavia, M. M., Fernández-Muino, M. A., Alonso-Torre, S. R., Huidobro, J. F., & Sancho, M. T. (2007). Evolution of acidity of honeys from continental climates: Influence of induced granulation. *Food chemistry*, 100(4), 1728-1733. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.019>
27. Chan-Rodríguez, D., Ramon-Sierra, J., Lope-Ayora, J., Sauri-Duch, E., Cuevas-Glory, L., & Ortiz-Vazquez, E. (2012). Antibacterial properties of honey produced by *Melipona beecheii* and *Apis mellifera* against foodborn microorganisms. *Food Science and Biotechnology*, 21(3), 905–909. doi:10.1007/s10068-012-0118-x

28. Chen, Y. H., Chuah, W. C., & Chye, F. Y. (2021). Effect of drying on physicochemical and functional properties of stingless bee honey. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(4), e15328. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15328>
29. Chua, L. S., Rahaman, N. L. A., Adnan, N. A., & Eddie Tan, T. T. (2013). Antioxidant activity of three honey samples in relation with their biochemical components. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2013(1), 313798. doi: 10.1155/2013/313798
30. Chuttong, B., Chanbang, Y., Srungarm, K., & Burgett, M. (2016). Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from South east Asia (Thailand). *Food chemistry*, 192, 149-155. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.089>
31. Codex Alimentarius CommissionRevised. Codex Standard for Honey. CODEX STAN 12–1981. Codex Alimentarius Commission. FAO/OMS. 2001. Rome, Italy. 7 pp.
32. Cortés, L. E. U. C., García, A. V., Maya, E. M. A., & Rivas, J. M. (2020). Conocimiento de las abejas nativas sin aguijón y cambio generacional entre los mayas lacandones de Nahá, Chiapas. *Estudios De Cultura Maya*, 56(2), 205–225. <https://doi.org/10.19130/iifl.ecm.2020.56.2.0008>
33. Creus, E. G. (2004). Alimentos prebióticos y probióticos: la polémica científica sobre sus beneficios. *Offarm: farmacia y sociedad*, 23(5), 90-98.
34. Cruz, L. C., Batista, J. E. S., Zemolin, A. P. P., Nunes, M. E. M., Lippert, D. B., Royes, L. F. F., & Franco, J. L. (2014). A study on the quality and identity of Brazilian Pampa biome honey: evidences for its beneficial effects against oxidative stress and hyperglycemia. *International Journal of Food Science*, 2014. doi: 10.1155/2014/470214
35. da Silva, I. A. A., da Silva, T. M. S., Camara, C. A., Queiroz, N., Magnani, M., de Novais, J. S., & de Souza, A. G. (2013). Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food chemistry*, 141(4), 3552-3558.
36. Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food chemistry*, 196, 309-323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>
37. Das, A., Datta, S., Mukherjee, S., Bose, S., Ghosh, S., & Dhar, P. (2015). Evaluation of antioxidative, antibacterial and probiotic growth stimulatory activities of Sesamum

- indicum honey containing phenolic compounds and lignans. *LWT-Food Science and Technology*, 61(1), 244-250. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.044>
38. Dawidowicz, A. L., & Olszowy, M. (2012). Mechanism change in estimating of antioxidant activity of phenolic compounds. *Talanta*, 97, 312-317. DOI: 10.1016/j.talanta.2012.04.036
39. de Almeida-Muradian, L. B., Stramm, K. M., Horita, A., Barth, O. M., da Silva de Freitas, A., & Estevinho, L. M. (2013). Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from *M elipona subnitida* and *Apis mellifera*. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(8), 1698-1706.. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12140>
40. de Melo, F. H. C., Menezes, F. N. D. D., de Sousa, J. M. B., dos Santos Lima, M., Borges, G. D. S. C., de Souza, E. L., & Magnani, M. (2020). Prebiotic activity of monofloral honeys produced by stingless bees in the semi-arid region of Brazilian Northeastern toward *Lactobacillus acidophilus* LA-05 and *Bifidobacterium lactis* BB-12. *Food Research International*, 128, 108809. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108809>
41. Di Gioia, D., Strahsburger, E., de Lacey, A. M. L., Bregola, V., Marotti, I., Aloisio, I., & Dinelli, G. (2014). Flavonoid bioconversion in *Bifidobacterium pseudocatenulatum* B7003: A potential probiotic strain for functional food development. *Journal of Functional Foods*, 7, 671-679. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.12.018>
42. Di Marco, G., Gismondi, A., Panzanella, L., Canuti, L., Impei, S., Leonardi, D., & Canini, A. (2018). Botanical influence on phenolic profile and antioxidant level of Italian honeys. *Journal of food science and technology*, 55(10), 4042-4050. doi:10.1007/s13197-018-3330-8
43. Dos Santos, A. C., Biluca, F. C., Braghini, F., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2021). Phenolic composition and biological activities of stingless bee honey: An overview based on its aglycone and glycoside compounds. *Food Research International*, 147, 110553.doi: 10.1016/j.foodres.2021.110553
44. Duarte, A. W. F., dos Santos Vasconcelos, M. R., de Menezes, A. P. D., da Silva, S. C., Oda-souza, M., & López, A. M. Q. (2012). Composition and antioxidant activity of honey from Africanized and stingless bees in Alagoas (Brazil): a multivariate analysis. *Journal of Apicultural Research*, 51(1), 23-35.<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.1.04>

45. El-Arab, A. M. E., Grgis, S. M., Hegazy, E. M., & El-Khalek, A. B. A. (2006). Effect of dietary honey on intestinal microflora and toxicity of mycotoxins in mice. *BMC Complement. Altern. Med.*, 6(6).
46. El-Nezami, H., Polychronaki, N., Salminen, S., & Mykkänen, H. (2002). Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative α -zearalenol. *Applied and environmental microbiology*, 68(7), 3545-3549. su derivado α -zearalenol. *Microbiología aplicada y ambiental* , 68 (7), 3545-3549.
47. Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., & Ab Wahab, M. S. (2012). Honey: a novel antioxidant. *Molecules*, 17(4), 4400-4423. doi: 10.3390/moléculas17044400
48. Erkkilä, S., Suihko, M. L., Eerola, S., Petäjä, E., & Mattila-Sandholm, T. (2001). Dry sausage fermented by *Lactobacillus rhamnosus* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 64(1-2), 205-210.
49. Escuredo, O., Míguez, M., Fernández-González, M., & Seijo, M. C. (2013). Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food chemistry*, 138(2-3), 851-856. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.066>.
50. Farina, W. M., Grüter, C., & Díaz, P. C. (2005). Social learning of floral odours inside the honeybee hive. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1575), 1923-1928. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3172>
51. Fattori, S. (2004). La miel" propiedades, composición y análisis fisicoquímico. Buenos Aires, Argentina: Apimondia.
52. Fauzi, A. N., Norazmi, M. N., & Yaacob, N. S. (2011). Tualang honey induces apoptosis and disrupts the mitochondrial membrane potential of human breast and cervical cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 49(4), 871-878.
53. Filannino, P., Di Cagno, R., & Gobbetti, M. (2018). Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: Get out of the labyrinth. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.016>
54. Fontané, L., Benaiges, D., Goday, A., Llauradó, G., & Pedro-Botet, J. (2018). Influencia de la microbiota y de los probióticos en la obesidad. *Clínica e investigación en arteriosclerosis*, 30(6), 271-279.

55. Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106-117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>
56. García-Chaviano, M. E., Armenteros-Rodríguez, E., Escobar-Álvarez, M. D. C., García-Chaviano, J. A., Méndez-Martínez, J., & Ramos-Castro, G. (2022). Composición química de la miel de abeja y su relación con los beneficios a la salud. *Revista Médica Electrónica*, 44(1), 155-167.
57. Ge, L., Li, S. P., & Lisak, G. (2020). Advanced sensing technologies of phenolic compounds for pharmaceutical and biomedical analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 179, 112913. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112913>
58. Gharzouli, K., Amira, S., Gharzouli, A., & Khennouf, S. (2002). Gastroprotective effects of honey and glucose-fructose-sucrose-maltose mixture against ethanol-, indomethacin-, and acidified aspirin-induced lesions in the rat. *Experimental and toxicologic pathology*, 54(3), 217-221.
59. Godocikova, J., Bugarova, V., Kast, C., Majtan, V., & Majtan, J. (2020). Antibacterial potential of Swiss honeys and characterisation of their bee-derived bioactive compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(1), 335-342. doi: 10.1002/jsfa.10043
60. Gómez Morales, L., Beltrán Romero, L. M., & García Puig, J. (2013). Azúcar y enfermedades cardiovasculares. *Nutrición Hospitalaria*, 28, 88-94.
61. Guarner, F., Khan, A. G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., & Kim, N. (2011). Probióticos y prebióticos. Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos, 1, 1-29.
62. Guerrero L. I., García A. B. E., Wacher R. M.C. & Regalado G.C. (2014). Probióticos. En *Microbiología de los alimentos*(405-433). México: Limusa.
63. Gutiérrez, A. A., Hernández, F. O., & Jones, R. W. (2002). Optimum brood size for artificial propagation of the stingless bee, *Scaptotrigona mexicana*. *Journal of apicultural research*, 41(1-2), 62-63.
64. Guzmán-Armentero, T. M., Anaya-Villalpanda, M., & Mesa-Mariño, Y. (2016). Activación de cultivos probióticos tratados con campo magnético de frecuencia extremadamente baja. *Tecnología Química*, 36(1), 84-92.

65. Habib, H. M., Al Meqbal, F. T., Kamal, H., Souka, U. D., & Ibrahim, W. H. (2014). Physicochemical and biochemical properties of honeys from arid regions. *Food chemistry*, 153, 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.048>
66. Hasyimi, W., Widanarni, W., & Yuhana, M. (2020). Growth performance and intestinal microbiota diversity in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed with a probiotic bacterium, honey prebiotic, and symbiotic. *Current Microbiology*, 77, 2982-2990. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02117-w>
67. Hatakka, K., Holma, R., El-Nezami, H., Suomalainen, T., Kuisma, M., Saxelin, M. & Korpela, R. (2008). The influence of *Lactobacillus rhamnosus* LC705 together with *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS on potentially carcinogenic bacterial activity in human colon. *International journal of food microbiology*, 128(2), 406-410.
68. Hau-Yama, N. E., Magaña-Ortiz, D., Oliva, A. I., & Ortiz-Vázquez, E. (2020). Antifungal activity of honey from stingless bee *Melipona beecheii* against *Candida albicans*. *Journal of Apicultural Research*, 59(1), 12-18.
69. Heard, T. A. (1999). The role of stingless bees in crop pollination. *Annual review of entomology*, 44(1), 183-206. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.183>
70. Hedges, L. V. (1981). Distribution theory for Glass's estimator of effect size and related estimators. *Journal of Educational Statistics*, 6(2), 107-128. <https://doi.org/10.2307/1164588>
71. Hernandez, A. G. D. (2010). Tratado de nutricion/Nutrition Treatise: Composicion y Calidad Nutritiva de los Alimentos/Composition and nutritional quality of foods (Vol. 2). Ed. Médica Panamericana.
72. Hernández-Fuentes, A. D., Chávez-Borges, D., de Jesús Cenobio-Galindo, A., Zepeda-Velázquez, A. P., Figueira, A. C., Jiménez-Alvarado, R., & Campos-Montiel, R. G. (2021). Characterization of total phenol and flavonoid contents, colour, functional properties from honey samples with different floral origins. *International Journal of Food Studies*, 10(2).
73. Herrero, B., María Valencia-Barrera, R., San Martín, R., & Pando, V. (2002). Characterization of honeys by melissopalynology and statistical analysis. *Canadian Journal of plant science*, 82(1), 75-82. doi: 10.4141/P00-187

74. Higgins, J. P., Thompson, S. G., Deeks, J. J., & Altman, D. G. (2003). Measuring inconsistency in meta-analyses. *bmj*, 327(7414), 557-560. doi: 10.1136/bmj.327.7414.557
75. Hutkins, R. W. (2008). *Microbiology and technology of fermented foods*. John Wiley & Sons.
76. Jamal, P., Idris, Z. M., & Alam, M. Z. (2011). Effects of physicochemical parameters on the production of phenolic acids from palm oil mill effluent under liquid-state fermentation by *Aspergillus niger* IBS-103ZA. *Food Chemistry*, 124(4), 1595-1602. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.022>
77. Jan Mei, S., Mohd Nordin, M. S., & Norrakiah, A. S. (2010). Fructooligosaccharides in honey and effects of honey on growth of *Bifidobacterium longum* BB 536. *Int Food Res J*, 17(3), 557-61.
78. Jan, N. U., Kifayatullah, M., Amin, F., Rahim, H., Abbas, S., Mohani, S. N. U. H., & Raza, M. (2022). Antioxidant and Cytotoxic activity of Steroidal Alkaloids Isolated from *Sarcococca saligna* against DPPH and HeLa Cell Lines. *INDIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL EDUCATION AND RESEARCH*, 56(2), 489-496. doi: 10.5530/ijper.56.2.70
79. Jay, J. M. (2002). *Microbiología moderna de los Alimentos*. (105-121) New York USA, Kluwer Academic/Plenum Publishers.
80. Jimenez, M., Beristain, C. I., Azuara, E., Mendoza, M. R., & Pascual, L. A. (2016). Physicochemical and antioxidant properties of honey from *Scaptotrigona mexicana* bee. *Journal of Apicultural Research*, 55(2), 151-160. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1205294>
81. Joan, E., Quintero, M., Acosta, C., Mejía, C., Ríos, R., & Torres, A. (2012). Lactic Acid
82. Julika, W. N., Ajit, A., Naila, A., & Sulaiman, A. Z. The effect of storage condition on physicochemical properties of some stingless bee honey collected in malaysian local market. *Materials Today: Proc.* 2022, 57, 1396-1402. DOI:10.1016/j.matpr.2022.03.238
83. Kaprasob, R., Kerdchoechuen, O., Laothakunjit, N., Sarkar, D., & Shetty, K. (2017). Fermentation-based biotransformation of bioactive phenolics and volatile compounds from cashew apple juice by select lactic acid bacteria. *Process Biochemistry*, 59, 141-149.

84. Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48(4), 412-422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
85. Kek, S. P., Chin, N. L., Yusof, Y. A., Tan, S. W., & Chua, L. S. (2014). Total phenolic contents and colour intensity of Malaysian honeys from the *Apis* spp. and *Trigona* spp. bees. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 150-155. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.022>
86. Kek, S. P., Chin, N. L., Yusof, Y. A., Tan, S. W., & Chua, L. S. (2017). Classification of entomological origin of honey based on its physicochemical and antioxidant properties. *International journal of food properties*, 20(sup3), S2723-S2738. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1359185>
87. Khongkwanmueang, A., Nuyu, A., Straub, L., & Maitip, J. (2020). Physicochemical profiles, antioxidant and antibacterial capacity of honey from stingless bee *Tetragonula laeviceps* species complex. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 141, p. 03007). EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014103007>
88. Khosravi, A., & Razavi, S. H. (2021). Therapeutic effects of polyphenols in fermented soybean and black soybean products. *Journal of Functional Foods*, 81, 104467. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104467>
89. Koethe, S., Fischbach, V., Banysch, S., Reinartz, L., Hrncir, M., & Lunau, K. (2020). A comparative study of food source selection in stingless bees and honeybees: scent marks, location, or color. *Frontiers in plant science*, 11, 516. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00516>
90. Landete, J. M. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food research international*, 44(5), 1150-1160. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.027>
91. Layek, U., Das, N., Kumar De, S., & Karmakar, P. (2023). The botanical origin of cerumen and propolis of Indian stingless bees (*Tetragonula iridipennis* Smith): pollen spectrum does not accurately indicate latex and resin sources. *Apidologie*, 54(2), 18. <https://doi.org/10.1007/s13592-023-00994-1>
92. Li, Y., Long, S., Liu, Q., Ma, H., Li, J., Xiaoqing, W., & Hou, B. (2020). Gut microbiota is involved in the alleviation of loperamide-induced constipation by honey

- supplementation in mice. *Food Science & Nutrition*, 8(8), 4388-4398. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1736>
93. Lira, A. F., de Mello Sousa, J. P. L., Lorenzon, M. C. A., Vianna, C. A. F. J., & Castro, R. N. (2014). Estudo comparativo do mel de *Apis mellifera* com méis de meliponíneos de diferentes regiões. *Acta Veterinaria Brasilica*, 8(3), 169-178. DOI: 10.21708/AVB.2014.8.3.3560
94. López-Garay, L. A., Trejo-Téllez, L. I., Gómez-Merino, F. C., Contreras-Oliva, A., Pérez-Sato, J. A., & Salinas-Ruiz, J. (2023). Physicochemical properties of *Scaptotrigona mexicana* honey from the Highlands of Veracruz, Mexico. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 10(1). <https://doi.org/10.19136/era.a10n1.3380>
95. Magaña Magaña, M. Á., Moguel Ordóñez, Y. B., Sanginés García, J. R., & Leyva Morales, C. E. (2012). Estructura e importancia de la cadena productiva y comercial de la miel en México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 3(1), 49-64.
96. Mahmood, R., Asif, J. A., & Shahidan, W. N. S. (2020). Stingless-bee (*Trigona itama*) honey adversely impacts the growth of oral squamous cell carcinoma cell lines (HSC-2). *European Journal of Integrative Medicine*, 37, 101162. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2020.101162>
97. Makawi, S. Z. A., Gadkariem, E. A., & Ayoub, S. M. H. (2009). Determination of antioxidant flavonoids in Sudanese honey samples by solid phase extraction and high performance liquid chromatography. *Journal of Chemistry*, 6, S429-S437. <https://doi.org/10.1155/2009/382504>
98. Manzanares, A. B., García, Z. H., Galdón, B. R., Rodríguez, E. R., & Romero, C. D. (2014). Physicochemical characteristics of minor monofloral honeys from Tenerife, Spain. *LWT-Food Science and technology*, 55(2), 572-578.
99. Marconi, M., Luna, J. O., & Giove, C. D. V. (2020). Physicochemical and microbiological quality of honeys produced by stingless bees *Scaptotrigona polysticta*, *Melipona illota* and *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini) in San Martín, Peru. *Peruvian Journal of Agronomy*, 4(2), 55-60. doi: 10.21704/pja.v4i2.1541
100. Maringgal, B., Hashim, N., Tawakkal, I. S. M. A., Mohamed, M. T. M., & Shukor, N. I. A. (2019). Phytochemical compositions and antioxidant activities of malaysian stingless bee honey. *Pertanika J. Sci. Technol*, 27, 15-28. DOI:[https://doi.org/10.26656/fr.2017.5\(S1\).006](https://doi.org/10.26656/fr.2017.5(S1).006)

101. Martinello, M., & Mutinelli, F. (2021). Antioxidant activity in bee products: A review. *Antioxidants*, 10(1), 71.
102. Martínez-Puc, J. F., Cetzel-Ix, W., González-Valdivia, N. A., Casanova-Lugo, F., & Saikat-Kumar, B. (2018). Caracterización de la actividad apícola en los principales municipios productores de miel en Campeche, México. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 5(1), 44-53.
103. Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 50(1), 5-18.
104. Mokaya, H. O., Nkoba, K., Ndunda, R. M., & Vereecken, N. J. (2022). Characterization of honeys produced by sympatric species of Afrotropical stingless bees (Hymenoptera, Meliponini). *Food chemistry*, 366, 130597. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130597>
105. Montaño, R. P. (2017). Las 5 enfermedades con mayor tasa de mortalidad relacionada con el consumo de azúcar “Azúcar la punta del Iceberg”.
106. Moreira, F. I. N., de Medeiros, L. L., de Carvalho, L. M., Olegario, L. S., de Sousa Galvão, M., da Franca, S. A. M., & Madruga, M. S. (2023). Quality of Brazilian stingless bee honeys: *Cephalotrigona capitata*/mombucão and *Melipona scutellaris* Latrelle/uruçu. *Food Chemistry*, 404, 134306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134306>
107. Morroni, G., Alvarez-Suarez, J. M., Brenciani, A., Simoni, S., Fioriti, S., Pugnaloni, A., & Giovanetti, E. Comparison of the antimicrobial activities of four honeys from three countries (New Zealand, Cuba, and Kenya). *Front. Microbiol.* 2018, 9, 1378. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01378>
108. Muñoz, E. N., & Santos, L. E. S. (2016). Abejas nativas, señoritas de la miel. Patrimonio cultural en el estado de Campeche / Native bees, honey ladies. Cultural heritage in the State of Campeche.
109. Ng, W. J., Sit, N. W., Ooi, P. A. C., Ee, K. Y., & Lim, T. M. (2020). The antibacterial potential of honeydew honey produced by stingless bee (*Heterotrigona itama*) against antibiotic resistant bacteria. *Antibiotics*, 9(12), 871. doi:10.3390/antibiotics9120871
110. Nordin, A., Sainik, N. Q. A. V., Chowdhury, S. R., Saim, A. B., & Idrus, R. B. H. (2018). Physicochemical properties of stingless bee honey from around the globe: A

- comprehensive review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 73, 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.06.002>
111. Nutter, J., Fritz, R., Iurlina, M. O., & Saiz, A. I. (2016). Effect of *Prosopis* sp. honey on the growth and fermentative ability of *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus fermentum*. *LWT*, 70, 309-314. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.009>
112. Nweze, J. A., Okafor, J. I., Nweze, E. I., & Nweze, J. E. (2017). Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of two stingless bee honeys: a comparison with *Apis mellifera* honey from Nsukka, Nigeria. *BMC research notes*, 10(1), 1-6. doi: 10.1186/s13104-017-2884-2
113. Oliveira, P. S., Müller, R. C. S., Dantas, K. D. G. F., Alves, C. N., Vasconcelos, M. A. M. D., & Venturieri, G. C. (2012). Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. *Química Nova*, 35, 1728-1732.
114. Olveira Fuster, G., & González-Molero, I. (2007). Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. *Nutrición hospitalaria*, 22, 26-34.
115. Organización Mundial de la Salud. (2025, 25 de septiembre). Enfermedades no transmisibles. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
116. Oršolić, N., Jazvinšćak Jembrek, M., & Terzić, S. (2017). Honey and quercetin reduce ochratoxin A-induced DNA damage in the liver and the kidney through the modulation of intestinal microflora. *Food and agricultural immunology*, 28(5), 812-833.
117. Otmani, A., Amessis-Ouchemoukh, N., Birinci, C., Yahiaoui, S., Kolayli, S., Rodríguez-Flores, M. S., & Ouchemoukh, S. (2021). Phenolic compounds and antioxidant and antibacterial activities of Algerian honeys. *Food Bioscience*, 42, 101070. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2021.101070>.
118. Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., & Moher, D. (2021). The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *bmj*, 372. <https://doi.org/10.1186/s13643-021-01626-4>
119. Palma Ramirez, G., Navarro Fernandez, A., Lozada Castillo, I., & Hernandez Valdes, F. (2015). El azúcar, tannociva como cualquier droga.
120. Pat Fernández, L. A., Anguebes Franceschi, F., Pat Fernández, J. M., Hernández Bahena, P., & Ramos Reyes, R. (2018). Condición y perspectivas de la

- meliponicultura en comunidades mayas de la reserva de la biosfera Los Petenes, Campeche, México. Estudios de cultura maya, 52, 227-254. <https://doi.org/10.19130/iifl.ecm.2018.52.939>
121. Pérez-Pérez, E., Rodríguez-Malaver, A., & Vit, P. (2007). Efecto de la fermentación postcosecha en la capacidad antioxidante de miel de *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811. BioTecnología, 10, 14-20.
122. Pimentel, T. C., Rosset, M., de Sousa, J. M. B., de Oliveira, L. I. G., Mafaldo, I. M., Pintado, M. M. E., ... & Magnani, M. (2022). Stingless bee honey: An overview of health benefits and main market challenges. *Journal of Food Biochemistry*, 46(3), e13883. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13883>
123. Ramly, N. S., Sujanto, I. S. R., Tang, J. Y. H., Abd Ghani, A., Alias, N., Bakar, M. F. A., & Ngah, N. (2021). Correlation between the color lightness and sweetness of stingless bee honey with its minerals content. *Journal of Agrobiotechnology*, 12(2), 88-96. <https://doi.org/10.37231/jab.2021.12.2.250>
124. Ramón-Sierra, J., Martínez-Guevara, J. L., Pool-Yam, L., Magana-Ortiz, D., Yam-Puc, A., & Ortiz-Vázquez, E. (2020). Effects of phenolic and protein extracts from *Melipona beecheii* honey on pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Science and Biotechnology*, 29(7), 1013-1021.
125. Ramón-Sierra, J., Peraza-López, E., Rodríguez-Borges, R., Yam-Puc, A., Madera-Santana, T., & Ortiz-Vázquez, E. (2019). Partial characterization of ethanolic extract of *Melipona beecheii* propolis and in vitro evaluation of its antifungal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29, 319-324.
126. Ramón-Sierra, J., Ruíz-Ruiz, J., & Ortiz-Vázquez, E. (2015). Electrophoresis characterisation of protein as a method to establish the entomological origin of stingless bee honeys. *Food chem.*, 183, 43-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.015>.
127. Ramos, D. A. L. (2021). La meliponicultura en Yucatán, un legado maya para proteger. Recuperado de: <https://ciatej.mx/el-ciatej/comunicacion/Noticias/La-meliponicultura-en-Yucatan--un-legado-maya-para-proteger/198>
128. Ranneh, Y., Akim, A. M., Hamid, H. A., Khazaai, H., Fadel, A., Zakaria, Z. A., & Bakar, M. F. A. (2021). Honey and its nutritional and anti-inflammatory value. *BMC complementary medicine and therapies*, 21(1), 1-17.

129. Rao, P. V., Krishnan, K. T., Salleh, N., & Gan, S. H. (2016). Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26, 657-664.
130. Razali, M. F., Mohd Fauzi, N. A., Sulaiman, A., Talip, B. A., & Rahman, A. A. (2019). Effect of high-pressure processing on prebiotic potential of stingless bee (Kelulut) honey: Tested upon *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus brevis*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(7), e13946. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13946>
131. Revelle, W. R. (2017). *psych: Procedures for personality and psychological research*. Research; Version = 2.1.9; Northwestern University: Evanston, IL, USA, 2021; Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=psych> (accessed on 4 October 2021).
132. Rodríguez-Malaver, A. J. (2012). Antioxidant activity of pot-honey. In *Pot-Honey: A legacy of stingless bees* (pp. 475-480). New York, NY: Springer New York.
133. Rosso londoño, j. M., & nates-parra, g. (2006). Meliponicultura: una actividad generadora de ingresos y servicios ambientales/LEISA, *Revista Agroecología* (No. ANALI).
134. Roubik, D. W. Nest and colony characteristics of stingless bees from Panama (Hymenoptera: Apidae). *J. Kans. Entomol. Soc.* 1983, 327-355. <http://www.jstor.org/stable/25084419>
135. Rozman, A. S., Hashim, N., Maringgal, B., & Abdan, K. (2022). A Comprehensive Review of Stingless Bee Products: Phytochemical Composition and Beneficial Properties of Honey, Propolis, and Pollen. *Applied Sciences*, 12(13), 6370. <https://doi.org/10.3390/app12136370>
136. Ruiz-Ruiz, J. C., Matus-Basto, A. J., Acereto-Escoffié, P., & Segura-Campos, M. R. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolic compounds isolated from *Melipona beecheii* honey. *Food and Agricultural Immunology*, 28(6), 1424-1437. <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1347148>
137. Sanches, M. A., Pereira, A. M. S., & Serrão, J. E. (2017). Pharmacological actions of extracts of propolis of stingless bees (Meliponini). *Journal of Apicultural Research*, 56(1), 50-57. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1260856>

138. Sanz París, Á., Boj Carceller, D., Melchor Lacleta, I., & Albero Gamboa, R. (2013). Azúcar y diabetes: recomendaciones internacionales. *Nutrición Hospitalaria*, 28, 72-80.
139. Sarmento Silva, T. M., dos Santos, F. P., Evangelista-Rodrigues, A., Sarmento da Silva, E. M., da Silva, G. S., & de Novais, J. S. (2013). Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *Journal of food composition and analysis (Print)*, 29(1), 10-18.
140. Savijoki, K., Lietzen, N., Kankainen, M., Alatossava, T., Koskenniemi, K., Varmanen, P., & Nyman, T. A. (2011). Comparative proteome cataloging of *Lactobacillus rhamnosus* strains GG and Lc705. *Journal of proteome research*, 10(8), 3460-3473.
141. Schell, K. R., Fernandes, K. E., Shanahan, E., Wilson, I., Blair, S. E., Carter, D. A., & Cokcetin, N. N. (2022). The potential of honey as a prebiotic food to re-engineer the gut microbiome toward a healthy state. *Frontiers in nutrition*, 9, 957932.
142. Seraglio, S. K. T., Schulz, M., Brugnerotto, P., Silva, B., Gonzaga, L. V., Fett, R., & Costa, A. C. O. (2021). Quality, composition and health-protective properties of citrus honey: A review. *Food Research International*, 143, 110268.
143. Shamala, T. R., Shri Jyothi, Y., & Saibaba, P. (2000). Stimulatory effect of honey on multiplication of lactic acid bacteria under in vitro and in vivo conditions. *Letters in applied microbiology*, 30(6), 453-455. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00746.x>
144. Shamsudin, S., Selamat, J., Abdul Shomad, M., Ab Aziz, M. F., & Haque Akanda, M. J. (2022). Antioxidant properties and characterization of *Heterotrigona itama* honey from various botanical origins according to their polyphenol compounds. *Journal of Food Quality*, 2022(1), 2893401. <https://doi.org/10.1155/2022/2893401>
145. Silva, I. P., Caldas, M. J. M., Machado, C. S., Nascimento, A. S. D., Lordêlo, M. S., Barbara, M. F. S., & Carvalho, C. A. L. D. (2021). Antioxidants activity and physicochemical properties of honey from social bees of the Brazilian semiarid region. *Journal of Apicultural Research*, 60(5), 797-806. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1823671>

146. Smetanska, I., Alharthi, S. S., & Selim, K. A. (2021). Physicochemical, antioxidant capacity and color analysis of six honeys from different origin. *Journal of King Saud University-Science*, 33(5), 101447.
147. Song, Y., Liu, Q., Munir, M., Gao, Y., He, J., Liu, L., & Qi, X. (2024). Effect of Lacticaseibacillus rhamnosus L08 fermentation on xanthine oxidase inhibitory activity and flavour profile of honeysuckle (*Lonicera japonica thunb.*). *Lwt*, 200, 116196.
148. Soto-Muciño, L.E., Chiatchoua, C., & Castañeda-González, Y. National and international panorama of honey production in Mexico. *ECORFAN Journal*. 2015, 1(1), 15-33.
149. Sousa, J. M., De Souza, E. L., Marques, G., Meireles, B., de Magalhães Cordeiro, Â. T., Gullón, B., & Magnani, M. (2016). Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by Meliponini in the Brazilian semiarid region. *Food Research International*, 84, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.012>
150. Souza, E. C. A., Menezes, C., & Flach, A. (2021). Stingless bee honey (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): A review of quality control, chemical profile, and biological potential. *Apidologie*, 52(1), 113-132.
151. Tuksitha, L., Chen, Y. L. S., Chen, Y. L., Wong, K. Y., & Peng, C. C. (2018). Antioxidant and antibacterial capacity of stingless bee honey from Borneo (Sarawak). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(2), 563-570. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2018.03.007>.
152. Valero-Cases, E., Nuncio-Jáuregui, N., & Frutos, M. J. (2017). Influence of fermentation with different lactic acid bacteria and in vitro digestion on the biotransformation of phenolic compounds in fermented pomegranate juices. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(31), 6488-6496.
153. Vargas-Martínez, L. I., García-Alvarado, M. Á., Robles-Olvera, V. J., & Hidalgo-Morales, M. (2019). Amaranth extracts as a substrate for the growth of *Lactobacillus plantarum*, a lactic acid bacterium with probiotic characteristics. *Espacio I+ D, Innovación más desarrollo*, 8(19).
154. Vit, P., Medina, M., & Eunice Enríquez, M. (2004). Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *Bee world*, 85(1), 2-5.

155. Vit, P., Yu, J. Q., & Huq, F. (2013). Use of honey in cancer prevention and therapy. In Pot-Honey (pp. 481-493). Springer, New York, NY.
156. Wakhungu, D. A., Namikoye, E. S., & Lattorff, H. M. G. (2022). Foraging range of an African stingless bee, *Hypotrigona gribodoi* (Apidae: Meliponini). *African Journal of Ecology*, 60(4), 1094-1098. <https://doi.org/10.1111/aje.13068>
157. Wang, Y., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2015). Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *Journal of bioscience and bioengineering*, 119(1), 10-18.
158. Wille, A. (1983). Biology of stingless bees. *Annu. Rev. Entomol.* 28(1), 41-64. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.28.010183.000353>
159. Winston, M. L. The biology of the honey bee. harvard university press. 1991.
160. Wong, P., Ling, H. S., Chung, K. C., Yau, T. M. S., & Gindi, S. R. A. (2019). Chemical Analysis on the Honey of *Heterotrigona itama* and *Tetrigona binghami* from Sarawak, Malaysia. *Sains Malaysiana*, 48(8), 1635-1642.
161. Xolalpa-Aroche, A., Hernandez-Mena, D. I., Moguel-Chin, W. I., Contreras-Peruyero, H., Rivero-Cruz, B. E., Ortiz-Vazquez, E., & Delgado-Suarez, E. J. (2024). Physicochemical Properties of Two Mexican Stingless Bee Honeys to Strengthen Their Biocultural Value. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 34(5), 1129-1139. <https://doi.org/10.1007/s43450-024-00566-z>
162. Ya'akob, H., Norhisham, N. F., Mohamed, M., Sadek, N., & Endrini, S. (2019). Evaluation of physicochemical properties of *trigona* sp. stingless bee honey from various districts of Johor. *J. Kejuruter*, 2, 59-67. [https://doi.org/10.17576/jkukm-2019-si2\(1\)-08](https://doi.org/10.17576/jkukm-2019-si2(1)-08)
163. Yang, F., Chen, C., Ni, D., Yang, Y., Tian, J., Li, Y., & Wang, L. (2023). Effects of fermentation on bioactivity and the composition of polyphenols contained in polyphenol-rich foods: A review. *Foods*, 12(17), 3315. doi: [10.3390/foods12173315](https://doi.org/10.3390/foods12173315)
164. Yücel, Y., & Sultanog, P. (2013). Characterization of honeys from Hatay Region by their physicochemical properties combined with chemometrics. *Food Bioscience*, 1, 16-25.
165. Zapata Bustamante, S., Tamayo Tenorio, A., & Alberto Rojano, B. (2013). Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(3), 391-404.

166. Zawawi, N., Chong, P. J., Mohd Tom, N. N., Saiful Anuar, N. S., Mohammad, S. M., Ismail, N., & Jusoh, A. Z. (2021). Establishing relationship between vitamins, total phenolic and total flavonoid content and antioxidant activities in various honey types. *Molecules*, 26(15), 4399.
167. Zehiroglu, C., & Ozturk Sarikaya, S. B. (2019). The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. *Journal of food science and technology*, 56(11), 4757-4774. doi: 10.1007/s13197-019-03952-x
168. Zepeda, R. (2022). MELIPONICULTURA Práctica milenaria. Recuperado de: <https://www.uv.mx/cienciauv/blog/meliponiculturapracticamilenaria/>
169. Zhang, S., Hu, H., Wang, L., Liu, F., & Pan, S. (2018). Preparation and prebiotic potential of pectin oligosaccharides obtained from citrus peel pectin. *Food chemistry*, 244, 232-237. doi: doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.071
170. Zirbes, L., Nguyen, B. K., de Graaf, D. C., De Meulenaer, B., Reybroeck, W., Haubruege, E., & Saegerman, C. (2013). Hydroxymethylfurfural: a possible emergent cause of honey bee mortality?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(49), 11865-11870. <https://doi.org/10.1021/jf403280n>

ANEXOS



antioxidants



Systematic Review

The Physicochemical Parameters, Phenolic Content, and Antioxidant Activity of Honey from Stingless Bees and *Apis mellifera*: A Systematic Review and Meta-Analysis

Ana Karen Zaldivar-Ortega ¹, Antonio de Jesús Cenobio-Galindo ¹, Nuria Morfin ² , Gabriel Aguirre-Álvarez ¹ , Rafael G. Campos-Montiel ^{1,†}, Nuria Esturau-Escofet ³ , Angel Garduño-García ^{4,*} and Juan Carlos Angeles-Hernandez ^{5,*}

¹ Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Avenida Universidad Km. 1 s/n Exhacienda Aquetzalpa, Tulancingo 43600, Mexico; ana_saldivar@uaeh.edu.mx (A.K.Z.-O.); antonio_cenobio@uaeh.edu.mx (A.d.J.C.-G.); aguirre@uaeh.edu.mx (G.A.-Á.); rcampos@uaeh.edu.mx (R.G.C.-M.)

² Michael Smith Laboratories, Department of Biochemistry & Molecular Biology, The University of British Columbia, Vancouver, BC V6T1Z4, Canada; nuriamorfin@tp-bchp.ca

³ Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico; nesturau@iquimica.unam.mx

⁴ Departamento de Ingeniería Mecánica Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco, Km 38.5, Texcoco 56230, Mexico

⁵ Departamento de Medicina y Zootecnia de Rumiantes, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico

* Correspondence: agardunog@chapingo.mx (A.G.-G.); juanangeles@fmvz.unam.mx (J.C.A.-H.); Tel.: +52-772-106-74-38 (J.C.A.-H.)

† This author has passed away.



Article

Functional Characterization of *Scaptotrigona mexicana* Honey: Physicochemical Properties, Antioxidant Capacity, and α -Amylase Inhibition for Food Process Applications

Ana Karen Zaldivar-Ortega ¹, Nuria Morfin ² , Juan Carlos Angeles-Hernandez ³, Lucio González-Montiel ⁴ , Macario Vicente-Flores ⁵, Gabriel Aguirre-Álvarez ^{1,*} and Antonio de Jesús Cenobio-Galindo ^{1,*}

¹ Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo de Bravo 43600, Hidalgo, Mexico; ana_saldivar@uaeh.edu.mx

² Department of Entomology, Faculty of Agricultural and Food Sciences, University of Manitoba, Winnipeg, MB R3T 2N2, Canada; nuria.morfin@umanitoba.ca

³ Departamento de Medicina y Zootecnia de Rumiantes, Universidad Nacional Autónoma de México Ciudad de México, Mexico City 04510, Mexico; juanangeles@fmvz.unam.mx

⁴ Instituto de Tecnología de los Alimentos, Universidad de la Cañada, Teotitlán de Flores Magón 68540, Oaxaca, Mexico; luciogonzalez@unca.edu.mx

⁵ Área Agroindustrial-Alimentaria, Universidad Tecnológica de Xicotepec de Juárez, Av. Universidad Tecnológica, Xicotepec de Juárez 73080, Puebla, Mexico; macario.vicenteflores@utxicotepec.edu.mx

* Correspondence: aguirre@uaeh.edu.mx (G.A.-Á.); antonio_cenobio@uaeh.edu.mx (A.d.J.C.-G.); Tel.: +52-775-111-50-18 (A.d.J.C.-G.)



Otorga la presente

CONSTANCIA

a: ANA KAREN ZALDIVAR ORTEGA

Por su participación como

PONENTE

en la modalidad **Cartel** del trabajo titulado

Caracterización fisicoquímica y nutricional de miel de Scaptotrigona mexicana del estado de Veracruz

cuyos autores son:

Ana K. Zaldivar-Ortega; Ana Figueira; Antonio J. Cenobio-Galindo; Isaac Almaraz-Buendía; Gabriel Aguirre-Álvarez;
Juan M. Vargas-Romero; Lorena Luna-Rodríguez; Rafael G. Campos-Montiel

Chapingo, Estado de México, del 03 al 06 de octubre de 2023.


Dra. Rosaura Reyes Canchola
Presidenta



bsas
Belfast '24

9-11 April 2024

The British Society of Animal Science (BSAS)

AWARD THIS CERTIFICATE OF ATTENDANCE TO

Maestra Ana Karen Zaldivar-Ortega

**The British Society of Animal Science (BSAS)
Annual Conference 2024**

9-11 April 2024
Belfast, Northern Ireland

Maggie

Maggie Mitchell

Chief Executive
BSAS

Elizabeth Magowan

Elizabeth Magowan

23-24 President
BSAS

www.bsas.org.uk/conference

Mexican Association of Food Science

THIS CERTIFICATE IS PRESENTED TO:

Fuentes-Ortiz, Zareth, Pérez-Lugo, Alejandra, Salto-Anguiano Samantha
Itzel, del Razo-Rodríguez, Oscar Enrique, Saucedo-Licona, Ruben
Adalberto, Muñoz-Benitez, Alfonso Longinos, Mendoza-Martínez, Carlos
Arturo, Zaldivar-Ortega, Ana Karen.

IN RECOGNITION BY ORAL PRESENTATION:

O P I V 3 4

**Physicochemical parameters, phenolic compounds and antioxidant activity of honey
from *Apis mellifera*, *Scaptotrigona mexicana* and *Melipona beecheii*.**

at the 11th International Food Science, Biotechnology and Safety
Congress Latin Food 2024 which took place on November 13-15 in
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Mexico.


Dr. César Ozuna López
PRESIDENT OF THE ORGANIZING
COMMITTEE


Dr. Gilber Vela Gutiérrez
PRESIDENT OF AMECA


Dra. Efigenia Montalvo González
PRESIDENT OF THE SCIENTIFIC
COMMITTEE

Mexican Association of Food Science

THIS CERTIFICATE IS PRESENTED TO:

Zaldivar-Ortega, Ana Karen; Cenobio-Galindo, Antonio de Jesús; Aguirre-Álvarez, Gabriel; González-Lemus, Uriel; Morfin, Nuria; Angeles-Hernández, Juan Carlos.

IN RECOGNITION BY ORAL PRESENTATION:

OP IV 32

Physicochemical parameters, phenolic compounds and antioxidant activity of honey from stingless and *Apis mellifera* bees: analytical review and meta-analysis

at the 11th International Food Science, Biotechnology and Safety Congress Latin Food 2024 which took place on November 13-15 in Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Mexico.



Dr. César Ozuna López
PRESIDENT OF THE ORGANIZING COMMITTEE



Dr. Gilber Vela Gutiérrez
PRESIDENT OF AMECA



Dra. Efigenia Montalvo González
PRESIDENT OF THE SCIENTIFIC COMMITTEE



EAAP

European Federation of Animal Science

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

I hereby confirm that

Ana Karen Zaldivar Ortega

attended the

Artificial Intelligence 4 Animal Science

Zurich, Switzerland

4-6 June 2025