



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CAMPECHE

POSTGRADO DE BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD
AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE Y CITOPROTECTOR DE LA MIEL DE *MELIPONA BEECHEII DEL ESTADO DE CAMPECHE*

ROMÁN ALBERTO LEÓN CANUL

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

SIHOCHAC, CHAMPOTÓN, CAMPECHE, MÉXICO

2022



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **Evaluación del efecto antioxidante y citoprotector de la miel de *Melipona beecheii* del estado de Campeche**, realizada por el estudiante: **Román Alberto León Canul**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA

DRA. ARELY ANAYANSI VARGAS DÍAZ

CO-DIRECTOR

DR. JUAN BAUTISTA CHALÉ DZUL

ASESOR

DR. ALBERTO SANTILLÁN FERNÁNDEZ

ASESOR

DR. RONALD FERRERA CERRATO

Sihochac, Champotón, Campeche, México, mayo de 2022

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE Y CITOPROTECTOR DE LA MIEL DE MELIPONA BEECHEII DEL ESTADO DE CAMPECHE.

Román Alberto León Canul, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2022

RESUMEN

El estado de Campeche alberga una diversidad de especies de abejas nativas sin aguijón, entre ellas, *Melipona beecheii*, cuya miel es valorada por su importancia sociocultural y por sus usos medicinales, como en el tratamiento de enfermedades oculares, respiratorias, cutáneas, etc. Dichas propiedades son atribuidas al origen floral, geográfico y especie de abeja, que le otorgan a la miel características fisicoquímicas específicas, además de diversos metabolitos secundarios, entre los que encontramos compuestos fenólicos y flavonoides. A los cuales se les atribuyen actividades biológicas como las: anticancerígena, cicatrizante, antimicrobiana y antioxidante. En el presente trabajo de investigación se colectaron 16 muestras de miel de *Melipona beecheii* en cuatro regiones del estado de Campeche (sureste, noreste, oeste y norte). Se determinó el origen floral de la miel mediante análisis melisopalinológico, se caracterizaron fisicoquímicamente, se determinó su capacidad antioxidante y se cuantificó el total de compuestos fenólicos y flavonoides. Asimismo, se evaluó su actividad citotóxica y citoprotectora en la línea celular Vero y se identificaron los flavonoides presentes en ellas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE). Los resultados indicaron que las muestra MC3 monofloral de *Bursera simaruba*, la muestra MC7 monofloral de *Senna racemosa*, la MC8 multifloral de *Senna racemosa* y *Mimosa bahamensis* y MC12 multifloral de *Bursera simaruba* y *Lonchocarpus longistylus*, fueron las mieles con mayor coloración, mayor contenido total de fenoles y flavonoides, capacidad antioxidante y efecto citoprotector por región geográfica. El análisis por CLAE reveló la presencia de los flavonoides naringina, miricetina, luteolina, quercetina, apigenina y kaempferol. Las dieciseis muestras de miel de *Melipona beecheii* del estado de Campeche, México, presentaron variación en su composición fisicoquímica, efecto antioxidante y citoprotector; asimismo, la composición química y la actividad biológica de la miel de *Melipona beecheii*, fueron altamente dependientes de la región geográfica de colecta y el origen botánico.

Palabras clave: *Melipona beecheii*, miel, melisopalinología, antioxidante, citoprotección.

EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT AND CYTOPROTECTIVE EFFECT OF *MELIPONA BEECHEII* HONEY FROM THE STATE OF CAMPECHE

Román Alberto León Canul, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2022

ABSTRACT

The state of Campeche houses a diversity species of native stingless bee, including *Melipona beecheii*, whose honey is valued for its sociocultural importance and its medicinal uses, on the treatment of ocular, respiratory and skin diseases. These properties can be influenced by several factors among them the geographical origin, floral source and bee species. In addition, these factors could affect the physicochemical characteristics, as well as the presence or absence of several secondary metabolites, among which we find phenolic and flavonoid compounds. The phenolic and flavonoids compounds are attributed various biological activities such as; anticancer, healing, antimicrobial and antioxidant. In the present investigation, 16 honey samples from *Melipon beecheii* were collected in four areas of the state of Campeche (southeast, northeast, west and north), the floral origin was determined by melissopalynological analysis, physicochemical characteristics, antioxidant activity, and the total phenolic and flavonoid content were determined. Likewise, its cytotoxic and cytoprotective activity was evaluated on the Vero cell line and flavonoids were identified by high-performance liquid chromatography (HPLC). The result showed that, the MC3 sample was monofloral of the *Bursera simaruba*, the MC7 sample was monofloral of *Senna racemosa*, the MC8 multifloral of *Senna racemosa* and *Mimosa Bahamensis* and MC12 multifloral of *Bursera simaruba* and *Lonchocarpus longistylus*. These were the honey sample with greater color, greater total phenol and flavonoid content, greater antioxidant capacity and cytoprotective effect in relation to the geographic region. HPLC Analysis revealed the presence of the flavonoids naringnin, miry cetina, luteolin, querce, apigenin and kaemferol. The sixteen honey samples from *Melipona beecheii* of the State of Campeche, Mexico, presented variation in its physicochemical composition, antioxidant effect and cytoprotective activity. The results indicate that the chemical composition and the biological activity of *Melipona beecheii* honey, are highly dependent on the geographical region of collection and botanical origin.

Key words: *Melipona beecheii*, honey, melissopalynology, antioxidant, cytoprotection

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mi formación académica y por el financiamiento otorgado al proyecto de ciencia básica A1-S-38721 “Titulado evaluación del efecto antioxidante y antifibrótico de la miel de *Melipona beecheii* de la península de Yucatán”.

A la Estrategia Nacional de Conservación y Uso Sustentable de Polinizadores (ENCUSP) por apoyar el proyecto CONV_ENCUSP_2022_04 “Alternativas para reducir factores asociados a la disminución de poblaciones de abejas sin aguijón”.

De igual forma, al proyecto de Ciencia Básica: SEP-CONACyT 257847 “Diversidad de meliponidos, estudio de sus microorganismos asociados y análisis de las propiedades biológicas de sus productos”.

Al Colegio de Postgraduados Campus Campeche y a la maestría en ciencias en Bioprospección y sustentabilidad agrícola, por todas las facilidades otorgadas, durante mi formación académica.

A la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). En particular al Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez y a los M. en C. Luis Torres y Mario Noh por todo el apoyo otorgado durante mi estancia de investigación.

Al Centro de Investigación en Salud “Dr. Jesús Kumate Rodríguez”, Unidad de Investigación Médica Yucatán, del Instituto Mexicano del Seguro Social. En especial a la Dra. Rosa Esther Moo Puc, por todas las facilidades otorgadas.

Al Departamento de Botánica del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY). De manera particular, al Dr. Juan Javier Ortiz Díaz y a la M en C. Kelly Duran Escalante, por el apoyo otorgado durante mi estancia.

Al Honorable Consejo Particular, que con sus aportaciones enriquecieron este trabajo de tesis.

A mis asesores por todo el apoyo otorgado durante la maestría, en especial a la Dra. Arely Anayansi Vargas Díaz y al Dr. Juan Bautista Chale Dzul, por los consejos, pero sobre todo por la dedicación y paciencia que mostraron para formarme, sacar adelante el proyecto y lograr todo lo que conseguimos.

A mis amigos Waldo y Majo que siempre me apoyaron, a mi familia y a toda la gente que conocí (Xochilt, Omegar y Joshua) durante mi formación académica, gracias por hacer el camino más ameno. A Moca y Scrapy que han estado conmigo en esas noches de desvelo.

MUCHAS GRACIAS.

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada a mi madre, María del Carmen Canul Puch, por todo el apoyo incondicional que siempre me ha dado y por siempre estar ahí cuando la he necesitado.

La segunda persona a la que le dedico esta tesis es a la primera persona que creyó en mí y que podría ser capaz de poder sacar adelante un proyecto tan bonito y que sin ayuda, apoyo, guía y entusiasmo no podría haber logrado, le agradezco de todo corazón el darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, obviamente hablo de mi consejera, la Dra. Arely Anayansi Vargas Díaz.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIA	vii
LISTA DE CUADROS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
ABREVIATURAS.....	xiv
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Las abejas y su clasificación	3
Abejas sin aguijón, características, distribución e importancia	4
Abejas sin aguijón en México.....	6
Hábitos de <i>Melipona beecheii</i>	9
La miel y su composición química.....	10
Fenoles y flavonoides en la miel de abejas sin aguijón	10
Factores que influyen en la composición física y química de la miel de las abejas sin aguijón.....	13
Origen geográfico y botánico.....	13
Composición fisicoquímica	15
Humedad	15
Sólidos solubles totales.....	16
Color	16
pH.....	17
Especie de himenóptero	17
Melisopalinología y su importancia para el análisis floral	18
Estudios melisopalinológicos en muestras de miel de <i>Melipona beecheii</i>	19
Radicales libres y su asociación con enfermedades.....	22
El sistema de defensa antioxidante	23
El sistema de defensa antioxidante de tipo enzimático	23

El sistema de defensa antioxidante de tipo no enzimático.....	23
La miel de ASA un alimento rico en fenoles y flavonoides con potencial antioxidante	24
La miel y sus propiedades citoprotectoras.....	26
CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN DE LOS RECURSOS FLORALES UTILIZADOS POR LA ABEJA SIN AGUIJÓN <i>MELIPONA BEECHEII</i> EN DISTINTAS REGIONES DEL ESTADO DE CAMPECHE, MÉXICO.....	27
1.1 RESUMEN	27
1.2 ABSTRACT	27
1.3 INTRODUCCIÓN	28
1.4 MATERIALES Y MÉTODOS	30
1.4.1 Área de estudio	30
1.4.2 Sitios de colecta de las muestras.....	30
1.4.3 Análisis palinológico	32
1.4.4 Origen botánico de la miel	33
1.4.5 Análisis ecológicos	33
1.5 RESULTADOS	34
1.5.1 Origen botánico de la miel	34
1.5.2 Parámetros ecológicos	46
1.5.3 Análisis de Componentes Principales (ACP)	46
1.6 DISCUSIÓN	47
1.7 CONCLUSIÓN.....	51
CAPITULO II. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS, COMPOSICIÓN QUÍMICA, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CITOPROTECTORA DE LA MIEL DE <i>MELIPONA BEECHEII</i> DE DIFERENTES REGIONES DEL ESTADO DE CAMPECHE	52
2.1 RESUMEN	52
2.2 ABSTRACT	53
2.3 INTRODUCCIÓN	53
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS	56
2.4.1 Colecta de las muestras de miel de <i>Melipona beecheii</i>	56
2.4.2 Análisis fisicoquímicos	56

2.4.2.1	Determinación del pH.....	56
2.4.2.2	Contenido de humedad y solidos solubles totales (azúcares).....	56
2.4.2.3	Determinación del color.....	56
2.4.3	Análisis de la composición química	57
2.4.3.1	Determinación del contenido total de fenoles (CTF)	57
2.4.3.2	Determinación del contenido total de flavonoides (CTFv).....	57
2.4.3.3	Determinación de la capacidad antioxidante libre de células	58
2.4.3.4	Obtención el extracto rico en flavonoides	59
2.4.3.5	Determinación del perfil de flavonoides en las muestras de miel de <i>M. beecheii</i>	59
2.4.4	Determinación del efecto citoprotector de las muestras de miel de <i>M. beecheii</i>	60
2.4.4.1	Preparación de las muestras de miel.....	60
2.4.4.2	Condiciones estándares de cultivo celular	60
2.4.4.3	Determinación del efecto citotóxico	60
2.4.4.4	Ensayo colorimétrico de SRB	61
2.4.4.5	Determinación del efecto citoprotector	61
2.4.4.6	Análisis estadísticos	62
2.5	RESULTADOS	63
2.5.1	Análisis fisicoquímicos	63
2.5.1.1	Valores de pH.....	63
2.5.1.2	Contenido de humedad.....	63
2.5.1.3	Solidos solubles totales (SST)	64
2.5.1.4	Color	64
2.5.2	Análisis Químico.....	67
2.5.2.1	Contenido total de fenoles (CTF)	67
2.5.2.2	Contenido total de flavonoides (CTFv).....	67
2.5.2.3	Capacidad antioxidante	68
2.5.2.4	Porcentaje de captura de radicales libres	68
2.5.3	Determinación del efecto citoprotector (CP) de las muestras de miel de <i>M. beecheii</i>	70

2.5.3.1 Determinación del efecto citotóxico	70
2.5.3.2 Determinación del efecto citoprotector	72
2.5.3.3 Análisis de componentes principales.....	75
2.5.4. Perfil de compuestos flavonoides por CLAE	76
2.6 DISCUSIÓN.....	79
2.7 CONCLUSIÓN.....	89
CONCLUSIONES GENERALES	90
LITERATURA CITADA.....	91
ANEXOS	112
Anexo I Vector propio de las especies de polen	112
Anexo II Dendrograma de análisis de conglomerados.....	113
Anexo III Vectores propios de las variables	114

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Especies de abejas sin aguijón por género en México	6
Cuadro 2. Abejas sin aguijón reportadas en la península de Yucatán y el estado de Campeche.....	7
Cuadro 3. Compuestos fenólicos identificados en miel de <i>M. beecheii</i>	13
Cuadro 4. Composición fisicoquímica, de la miel de <i>M. beecheii</i>	17
Cuadro 5. Especies polínicas reportadas en <i>M. beecheii</i>	21
Cuadro 6. Contenido de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante reportada en la miel de <i>M. beecheii</i>	26
Cuadro 7. Identificación de los sitios de colecta de las muestras de miel de <i>M. beecheii</i> y la vegetación predominante por sitio.....	32
Cuadro 8. Tipos de polen encontrados en muestras de <i>M. beecheii</i> del estado de Campeche	37
Cuadro 9. Variación en los parámetros fisicoquímicos de la miel de <i>M. beecheii</i>	66
Cuadro 10. Variación en el contenido de fenoles, flavonoides y efecto antioxidante de la miel de <i>M. beecheii</i>	69
Cuadro 11. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre el color, CTF, CTFv, CRL, CAEA y CP, de las muestras de miel de <i>M. beecheii</i>	70
Cuadro 12. Concentración citotóxica cincuenta en la línea celular Vero de las muestras de miel de <i>M. beecheii</i>	72
Cuadro 13. Compuesto flavonoides identificados por CLAE-UV en muestras de miel de <i>M. beecheii</i>	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de las abejas	3
Figura 2. Distribución de las ASA en zonas tropicales y subtropicales del mundo.	5
Figura 3. Distribución de <i>M. beecheii</i>	8
Figura 4. Región geográfica de colecta de las muestras de miel de <i>M. beecheii</i>	31
Figura 5. Caracterización de las muestras de miel recolectadas en diferentes regiones de Campeche... ..	36
Figura 6. Granos de polen predominantes observados en muestras de mieles de <i>M. beecheii</i> de Campeche, México.....	45
Figura 7. Análisis de componentes principales del origen botánico de la miel de <i>M. beecheii</i> del estado de Campeche.	47
Figura 8. Porcentaje de las muestras de miel de <i>M. beecheii</i> clasificadas en función de la escala Pfund... ..	65
Figura 9. Efecto de la miel de <i>M. beecheii</i> colectada in diferentes regiones del estado de Campeche en la viabilidad celular... ..	71
Figura 10. Efecto citoprotector de la miel de <i>M. beecheii</i> colectada in diferentes regiones del estado de Campeche en un modelo de daño en líneas celulares, inducido con H ₂ O ₂	73
Figura 11. Análisis comparativo del efecto citoprotector de las muestras de miel de <i>M. beecheii</i> en función de la región de colecta... ..	74
Figura 12. Análisis de componentes principales (PCA)... ..	76
Figura 13. Cromatograma, por cromatografía líquida de alta eficiencia... ..	78

ABREVIATURAS

AA: Ácido ascórbico

ABTS: 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

ANOVA: Análisis de varianza

ASA: Abejas sin aguijón

C_{AA}: Concentración de ácido ascórbico

CAEA: Capacidad antioxidante en equivalentes de ácido ascórbico

CC₅₀: concentración citotóxica cincuenta

C_{GA}: Concentración del ácido gálico

CLAE: Cromatografía líquida de alta eficiencia

CRL: Porcentaje de captura de radicales libres

CTF: Contenido total de fenoles

CTFv: Contenido de flavonoide totales

DF: Factor de dilución

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

ERN: Especies reactivas de nitrógeno

EROs: Especies reactivas del oxígeno

EO: Estrés oxidativo

FRAP: Capacidad antioxidante para reducir el ion férrico

GAE: Equivalentes de ácido gálico

MEM: Medio esencial mínimo

ORAC: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno

PCA: Análisis de componentes principales

QE: Quercetina

r: coeficientes de correlación de Pearson

RL: Radicales libres

SFB: Suero fetal bovino

Sili: Silimarina

SRB: Sulforodamina B

SST: Sólidos solubles totales

CP: Citoprotección

Mo: Monofloral

Mu: Multifloral

ND: No determinado

TCA: Ácido tricloroacético

tR: tiempo de retención

Vero: línea celular de riñón de mono verde africano

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las abejas son de gran importancia biológica por su desempeño como polinizadores de diversas especies vegetales, tanto de flora nativa como de cultivos de importancia comercial (Gleiciani & Campos, 2014). A nivel mundial se registran aproximadamente 20,000 especies de abejas, de las cuales 511 especies son denominadas como abejas sin aguijón (ASA) (Quezada-Euán, 2018). En México se reconocen 46 especies de ASA, distribuidas en 17 géneros (Ayala, 1999). En la península de Yucatán se reportan un total de 20 especies (Ayala *et al.*, 2013), en tanto que el estado de Campeche alberga un total de 12 especies (Cab-Baqueiro *et al.*, 2021). La especie de mayor importancia desde tiempos prehispánicos es *Melipona beecheii* (Bennett, 1831), también conocida en la región como “Xunaan kab” (Quezada-Euán & Alves, 2020).

La ASA *M. beecheii* pertenece a la tribu Meliponini y es considerada de gran importancia entre los habitantes de la Península de Yucatán (Quezada-Euán, 2018), debido a que es la especie con mayor rendimiento de miel, y adicionalmente, se le atribuyen diversos efectos terapéuticos sobre enfermedades del sistemas respiratorio (tos, laringitis, sinusitis y bronquitis), digestivo (disentería, gastritis y úlceras), sensorial (cicatrización en la piel e infecciones en la piel, ojos, oídos, boca, lengua, encías y los dientes), inmune (diabetes) y neurológico (epilepsia) (Ocampo-Rosales, 2013; Cauich-Kumul *et al.*, 2015; Ortiz-Vázquez *et al.*, 2016; Quezada-Euán, 2018).

Por otra parte, se ha descrito la asociación de algunas de estas enfermedades con el daño ocasionado por los radicales libres (RL) a las células. Recientemente, se reportó que la miel de *M. beecheii* posee actividad antioxidante (Moo-Huchin *et al.*, 2015; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2017; Alvarez-Suarez *et al.*, 2018; Sierra *et al.*, 2020), es decir, que tiene la capacidad de neutralizar o reducir la reactividad de los RL (Pyrzynska & Pękal, 2013). Esta capacidad puede estar asociada a la presencia de fenoles y flavonoides (Alvarez-Suarez *et al.*, 2018; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2017; Sánchez-Chino *et al.*, 2019; Martinello & Mutinelli, 2021). En este contexto, Ruiz-Ruiz *et al.* (2017) mostraron que los flavonoides en la miel de *M. beecheii* son capaces de proteger la membrana del eritrocito a una concentración de 0.42 mg mL⁻¹. En tanto que, Alvarez-Suarez *et al.* (2018) reportaron que el contenido de fenoles y flavonoides en las muestras de la miel de *M. beecheii* se

relaciona con su capacidad de captura de radicales libres. Entre los compuestos fenólicos y flavonoides identificados en la miel de *M. beecheii* se encuentran el ácido clorogénico, ácido cafeico, quercetina, ácido elágico, miricetina, catequina, luteolina, isorhamnetina, kaempferol y apigenina (Alvarez-Suarez *et al.*, 2018; Sierra *et al.*, 2020).

Adicionalmente, se ha descrito que la composición química de la miel y, por lo tanto, su actividad biológica, es altamente dependiente de diversos factores, entre ellos: el origen botánico, la especie de himenóptero, las condiciones climáticas, el tiempo de almacenamiento de la miel y la zona geográfica (Mohammed, 2020). En este entendido, a nivel nacional, el estado de Campeche es uno de los principales productores de miel de *M. beecheii* (Pat-Fernández *et al.*, 2018), cuenta con tres tipos de vegetación predominante (selva mediana caducifolia, selva mediana subcaducifolia selva mediana subperennifolia) (Crescencio, 2003) y con gran diversidad de recursos néctar-poliníferos. Sin embargo, se carecen de estudios que describan las preferencias vegetales de la especie *M. beecheii* para la producción de la miel. Asimismo, no existen reportes de la asociación del origen botánico y geográfico con la actividad antioxidante y citoprotectora de la miel. Con estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antioxidante y citoprotector de las muestras de miel de *M. beecheii* de diferentes regiones geográficas en el estado de Campeche, para determinar su potencial como alimento funcional. Por lo tanto, este estudio contribuirá a identificar los recursos vegetales aprovechados por *M. beecheii*, en diferentes regiones geográficas en el estado de Campeche, identificar las características fisicoquímicas de la miel, cuantificar su contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, identificar los flavonoides mediante cromatografía líquida de alta eficiencia y relacionarlos con su capacidad antioxidante y efecto citoprotector.

REVISIÓN DE LITERATURA

Las abejas y su clasificación

Las abejas son el grupo de insectos más diverso, albergando aproximadamente 20,000 especies (Quezada-Euán, 2018). Las abejas se diferencian de otros insectos por su cuerpo robusto, pelos plumosos, dos pares de alas y partes bucales succionadoras (Arnold *et al.*, 2018). Pertenecen a la subclase Aculeata, que hace referencia a insectos cuyo aparato ovopositor se encuentra modificado y, en su lugar, cuenta con un aguijón (Michener, 2000). También pertenecen al orden Himenóptera (Michener, 1974), a la súper familia Apoidea (Michener, 2000), a la familia Apidae y a la subfamilia Apinae. Sus miembros cuentan con una estructura denominada corbícula o canasta, la cual es una cavidad desnuda de la tibia de sus patas traseras (Quezada-Euán, 2018) destinada al transporte de polen (Michener, 1999). La subfamilia Apinae (**Figura 1**) cuenta con cuatro tribus: Euglossini (abejas de las orquídeas), Apini (abejas), Bombini (abejorros), y Meliponini (abejas sin aguijón) (Michener, 2000).

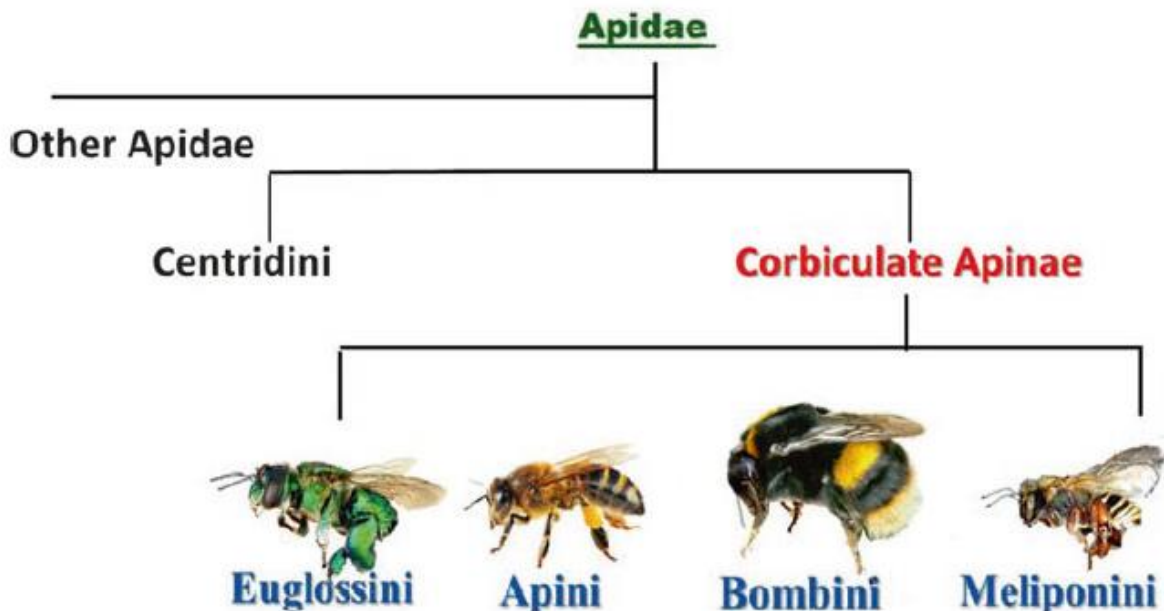


Figura 1. Clasificación de las abejas. Tomado de; Stingless bees of Mexico: The biology, management and conservation of an ancient heritage (Quezada- Euán, 2018).

La mayoría de las abejas suelen ser solitarias (aproximadamente el 95%), sin embargo, el 5% restante son consideradas altamente sociales o eusociales (Arnold *et al.*, 2018). De acuerdo con Michener (1974), las abejas eusociales se distinguen por estar constituidas por tres grupos de individuos o castas: la reina, las obreras y los zánganos (machos). Cada casta tiene una función definida y desempeñan un trabajo específico en la colonia. Ejemplos de ellas son las abejas melíferas (Apini) y las abejas sin aguijón (ASA) (Meliponini) (Michener, 1974). Ambas tribus (Apini y Meliponini), son las principales productoras de miel, sin embargo, no son reconocidas como parientes cercanos, ya que la información biogeográfica y molecular indica que dichas tribus divergieron hace aproximadamente 100 millones de años (Vit *et al.*, 2013).

Abejas sin aguijón, características, distribución e importancia

Las abejas sin aguijón también conocidos como meliponinos pertenecen a la familia Apidae y tribu Meliponini. Se diferencian de otras abejas, por la falta de venas transversales submarginales y la segunda vena recurrente en el ala anterior (Michener, 2013). Este grupo de abejas carece de aguijón, poseen un peine de cerdas rígidas en el margen interno de la corbícula. Otras características son la ausencia de palpos maxilares, espolones tibiales, presencia de glándulas productoras de cera en la parte dorsal del metasoma (Quezada-Euán, 2018).

Las ASA son consideradas el grupo más grande de abejas eusociales, con una morfología, hábitos de construcción de nidos, comportamiento y ecología extremadamente diversa (Hrncir *et al.*, 2016). Son abejas de tamaño pequeño a mediano (2-13 mm de longitud), con poblaciones variables de cientos hasta 10,000 obreras. Presentan una alta tasa de reproducción de crías y requieren grandes cantidades de polen para su ingesta (Ramalho *et al.*, 1998; Roubik, 1992; Michener, 2000; Arnold *et al.*, 2018). Las ASA se distribuyen en la regiones tropicales y subtropicales de planeta **(Figura 2)**: desde Uruguay hasta la parte central de México, y desde África, India, Malasia, Indonesia hasta Australia (Camargo & Pedro, 2003; de Camargo, 2013). Se han descrito aproximadamente 500 especies de ASA divididas en 56 géneros. De este total, 400 especies han sido descritas en las regiones neotropicales, y se estima que más de 100 especies aun esta por describirse (Michener, 2000).

Las ASA son de gran importancia, debido al papel primordial que desempeñan como polinizadores, son los responsables de mantener el flujo genético de una gran variedad de plantas nativas en las regiones tropicales y subtropicales del planeta (más del 80%) (Kwapong *et al.*, 2018). A nivel ecológico y evolutivo, algunas especies vegetales han desarrollado una simbiosis con sus polinizadores nativos, por lo que la ausencia del polinizador podría significar la desaparición de la especie vegetal (Roubik, 1992; Michener, 2000). Adicionalmente, las ASA son de gran importancia en la polinización de muchos cultivos de importancia comercial (Cham *et al.*, 2019). Por lo tanto, las ASA están vinculadas con la seguridad alimentaria, la preservación y riqueza de la flora nativa en regiones tropicales y subtropicales (Vit *et al.*, 2013; Arnold *et al.*, 2018).

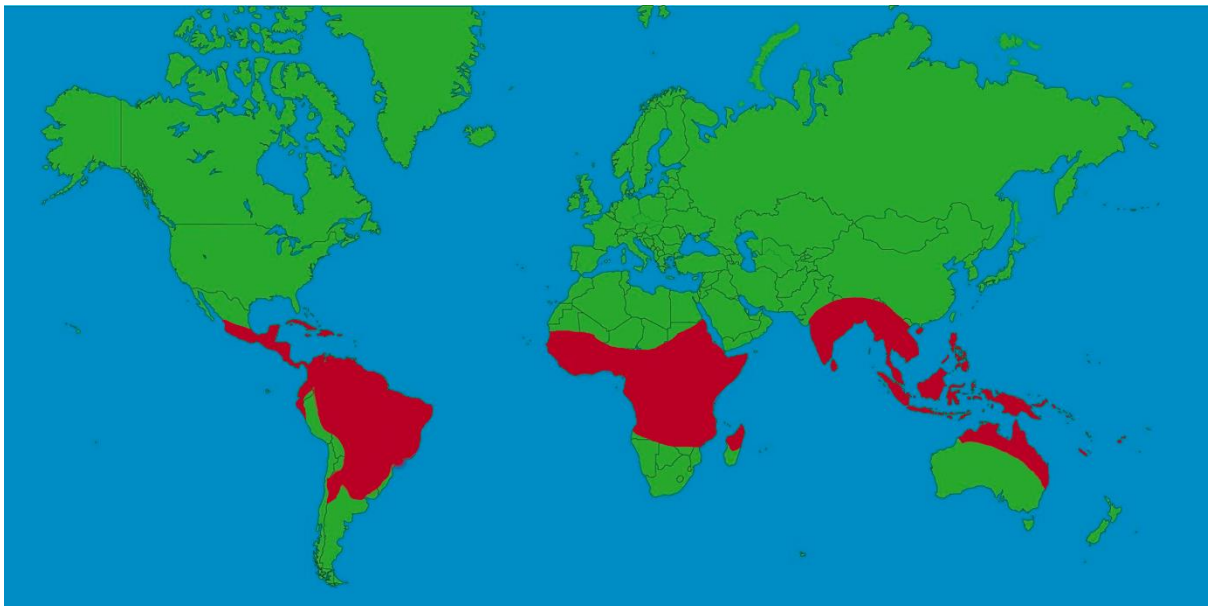


Figura 2. Distribución de las ASA en zonas tropicales y subtropicales del mundo. Basado en Cham *et al.* (2019).

Entre otras funciones, se encuentra el papel que desempeñan en la cadena trófica, donde sirven de alimento para otras especies, o la miel almacenada que producen es utilizada como fuente de carbohidratos por otros insectos o animales (Vit *et al.*, 2013). Finalmente, la miel de estas abejas representa un ingreso económico para los pequeños productores, ya que es una miel considerada rica en moléculas químicas a la que se le atribuyen diversas propiedades medicinales desde tiempos ancestrales, por lo que, es altamente demandada y valorada en el comercio local (Quezada-Euán, 2018).

Abejas sin aguijón en México

En México se reconocen 46 especies de ASA, distribuidas en 17 géneros (**Cuadro 1**). Los géneros con mayor número de especies corresponden a *Plebeia* (11), *Melipona* (6), *Trigona* (5) y *Trigonisca* (5) (Ayala, 1999).

Cuadro 1. Especies de abejas sin aguijón por género en México

Genero	Número especies
<i>Plebeia</i>	11
<i>Melipona</i>	6
<i>Trigona</i>	5
<i>Trigonisca</i>	5
<i>Scaptotrigona</i>	3
<i>Cephalotrigona</i>	3
<i>Partamona</i>	2
<i>Lestrimelitta</i>	2
<i>Nannotrigona</i>	1
<i>Oxytrigona</i>	1
<i>Scaura</i>	1
<i>Tetragona</i>	1
<i>Tetragonisca</i>	1
<i>Frieseomelitta</i>	1
<i>Geotrigona</i>	1
<i>Nogueirapis</i>	1
<i>Proplebeia</i>	1
Total	46

La distribución de las ASA en México se puede dividir en tres grupos ecológicos: (I) especies ampliamente distribuidas y asociadas con los bosques tropicales caducifolios y perennifolios; (II) especies asociadas con el bosque tropical perennifolio; y (III) especies endémicas asociadas con varios tipos de bosques (Ayala *et al.*, 2013). De las 46 especies a nivel nacional, en la Península de Yucatán se reportan un total de 20 especies (**Cuadro 2**), de las cuales 12 se encuentran en el estado de Campeche: *M. beecheii*, *Cephalotrigona zexmeniae* (Cockerell, 1912), *Lestrimelitta niitkib* (Ayala, 1999), *Partamona bilineata* (Say, 1837), *Scaptotrigona pectoralis* (Dalla Torre, 1896), *Nannotrigona perilampoides* (Cresson, 1879), *Frieseomelitta nigra* (Cresson, 1879), *Trigona fulviventris* (Guérin-Méneville, 1844), *Trigona fuscipennis* (Friese, 1900), *Trigona*

silvestriana (Vachal, 1908), *Trigona corvina* (Cockerell, 1913) y *Plebeia frontalis* (Friese, 1911) (Ayala *et al.*, 2013; Cab-Baqueiro *et al.*, 2021). De todas ellas, *M. beecheii* es la de mayor importancia.

Cuadro 2. Abejas sin aguijón reportadas en la península de Yucatán y el estado de Campeche

Especie	Península de Yucatán	Campeche (*)
<i>Melipona beecheii</i> Bennett	*	*
<i>Melipona yucatanica</i>	*	Nr
<i>Cephalotrigona zexmeniae</i>	*	*
<i>Lestrimelitta niitkib</i>	*	*
<i>Partamona bilineata</i>	*	*
<i>Scaptotrigona pectoralis</i>	*	*
<i>Nannotrigona perilampoides</i>	*	*
<i>Frieseomelitta nigra</i>	*	*
<i>Trigona fulviventris</i>	*	*
<i>Trigona fuscipennis</i>	*	*
<i>Trigona silvestriana</i>	*	*
<i>Trigona corvina</i>	*	*
<i>Plebeia frontalis</i>	*	*
<i>Plebeia moureana</i>	*	Nr
<i>Plebeia parkeri</i>	*	Nr
<i>Plebeia pulchra</i>	*	Nr
<i>Plebeia jaitiformis</i>	*	Nr
<i>Plebeia melanica</i>	*	Nr
<i>Trigonisca maya</i>	*	Nr
<i>Trigonisca pipioli</i>	*	Nr
Total	20	12

*Indica la presencia de la especie. Nr: no reportada

Melipona beecheii

En México, el género *Melipona* representa el 15% de las especies de ASA (Ayala *et al.*, 2013). En este género se encuentra *M. beecheii* conocida como “Xunan-Kab” en la cultura maya, la cual se distribuye en el neotrópico, en los países de Costa Rica, Cuba, las Antillas, Guatemala y México (**Figura 3**). En México se encuentra en la Península de Yucatán, Costa del Golfo (Tabasco, Tamaulipas y Veracruz) y Costa del Pacífico (Chiapas, Jalisco, Nayarit, Oaxaca), en San Luis Potosí y Zacatecas (Quezada-Euán, 2018).



Figura 3. Distribución de *M. beecheii*. Tomado de Stingless bees of México: The biology, management and conservation of an ancient heritage (Quezada- Euán, 2018).

Entre las características morfológicas de esta especie se encuentran: tegumento negro con marcas variables amarillas, rojas o negras en las piernas; longitud del cuerpo de 9.7 a 10.7 mm; frente del escapo antenal amarillo; escudo del tórax con pelo naranja y amarillo. Cuenta con mechones laterales de densos pelos que van de un rojo a anaranjado que genera un fuerte contraste con el resto del scutum. Se distinguen por poseer un abdomen negro con bandas amarillas bien definidas (Quezada-Euán, 2018).

Esta abeja es de gran importancia sociocultural en la Península de Yucatán y Guatemala ya que formó parte de la cosmogonía y la mitología en la cultura Maya (Quezada-Euán, 2018). Actualmente, existe evidencia de meliponicultura en la antigüedad y esta corresponde con la cultura maya, datando de hace aproximadamente 1400-1900 años. Se han encontrado piezas arqueológicas, incensarios, discos de piedra para sellar colmenas de troncos, una colmena de cerámica y, sobre todo, el códice de Madrid, en el que se retratan representaciones de *M. beecheii* por sacerdotes y dioses (Quezada-Euán & Alves, 2020). Hasta la fecha, ninguna otra cultura confirió tal significado, dándoles importancia medicinal, espiritual, mitológica y cultural (Quezada-Euán, 2018). Los mayas

utilizaban la miel de *M. beecheii* para acelerar la curación de heridas, quemaduras, la reducción y curación de cataratas, pterigión ocular y conjuntivitis. Actualmente, las comunidades mayas utilizan la miel para el tratamiento de enfermedades como laringitis, sinusitis, fiebre tifoidea, bronquitis, tos e infecciones bacterianas (Ortiz-Vázquez *et al.*, 2016).

Hábitos de *Melipona beecheii*

El nido en *M. beecheii* es fundamental ya que allí se desarrollan, se alimentan y se reproducen (Roubik, 2006). En general, el espacio requerido para anidar es en función del tamaño de la colonia. *M. beecheii* habita preferentemente en selvas tropicales vírgenes, pueden anidar en troncos y tallos de árboles, pero igual en espacios alternativos como rocas o edificios, lo que les permite anidar en áreas comparativamente menos conservadas (Quezada-Euán, 2018). El material básico para la elaboración del nido es el cerumen, el cual proviene de la mezcla de cera que ellas mismas producen en sus glándulas abdominales dorsales y resinas recolectadas de varias plantas. Una capa de cerumen sólido mezclado con propóleo (a veces también mezclado con barro) conocida como betún, se usa para cubrir el interior del nido (Quezada-Euán, 2018). El betún se utiliza para alinear la cavidad y aislar el nido de los cambios de temperatura. También construyen estructuras de cerumen llamadas macetas o tarros donde almacenan la miel y el polen (Roubik, 2006). El polen y la miel se almacenan por separado, lo que significa que hay tarros de polen y de miel, que suelen ser de tamaño similar y están entremezcladas (Roubik, 2006).

El área de cría es la sección del nido que contiene las celdas construidas con cerumen con individuos en desarrollo. Los obreros recién eclosionados y la reina, se encuentran con mayor frecuencia en el área de cría (Quezada-Euán, 2018). Como todos los himenópteros, *M. beecheii* es holometábola, es decir, tiene cinco etapas principales en el desarrollo ontogenético: huevo, larva, pre pupa, pupa y adulto o imago (Savard *et al.*, 2006). El tiempo total para el desarrollo depende de la casta; el de las obreras es de 53 ± 1 días, las reinas con 51 ± 1 días y los zánganos con 53.5 ± 1 días (Quezada-Euán, 2018). Cuando emerge el adulto, los trabajadores retiran los restos del capullo para la limpieza del nido (Quezada-Euán, 2018). *M. beecheii*, crea vertederos de desechos

temporales que se pueden distribuir en diferentes partes del nido y eventualmente algunos trabajadores especializados los retiran de la colonia (Medina-Medina *et al.*, 2014).

La miel y su composición química

La miel se puede definir como un producto natural producido por las abejas a partir del néctar y el polen de las plantas que recolectan y transforman mediante sus secreciones enzimáticas (Ahmed *et al.*, 2018), que depositan, deshidratan, almacenan para su maduración (Codex alimentarius, 2003). En su composición química se han descrito aproximadamente 181 compuestos entre ellos: azúcares, proteínas, minerales, enzimas, siendo los carbohidratos (60-85%) y agua (12-23%) sus principales componentes (Ahmed *et al.*, 2018). Además, de la fructosa y la glucosa, otros disacáridos identificados incluyen maltosa, sacarosa, maltulosa, turanosa, isomaltosa, laminaribiosa, nigerosa, kojibiosa, gentiobiosa y B-trehalosa. Los trisacáridos incluyen maltotriosa, erlosa, melecitosa, centosa 3-a5, isomaltosilglucosa, l-kestosa, isomaltotriosa, panosa, isopanosa y teandrosa (Rahman *et al.*, 2013). También, posee vitaminas como riboflavina, niacina, ácido fólico, ácido pantoténico, vitamina B6 y ácido ascórbico. Diferentes oligoelementos como; cobre calcio, hierro, zinc, potasio, fósforo, magnesio, selenio, cromo y manganeso. Las enzimas presentes en la miel son glucosa oxidasa, sacarosa diastasa, catalasa y fosfatasa ácida (De-Melo *et al.*, 2018). Entre los ácidos orgánicos reportados están: el ácido acético, butírico, cítrico, succínico, láctico, málico y glucónico (Atrouse *et al.*, 2004). Otro grupo de compuestos importantes son los compuestos fenólicos y flavonoides (Ahmed *et al.*, 2018). Estos compuestos se encuentran en cantidades diferentes dependiendo de la vegetación de la cual las abejas colecten el néctar y el polen (Ball, 2007).

Fenoles y flavonoides en la miel de abejas sin aguijón

De las aproximadamente 200,000 especies de plantas, se han identificado aproximadamente 8,000 metabolitos de tipo fenol y flavonoide (Pereira *et al.*, 2009). En las plantas estos compuestos tienen diversas funciones, como mecanismos de defensa, atracción de polinizadores, protección UV etc. (Piasecka *et al.*, 2015). Recientemente, se

ha generado gran interés en la comunidad científica por las diferentes actividades biológicas que se les atribuyen, como la actividad antimicrobiana, anticancerígena y antioxidante (Panzella *et al.*, 2020). La estructura característica de dichos compuestos, consta de un anillo aromático, los cuales contienen grupos hidroxilos libres o conjugados, sus rutas de biosíntesis son la ruta del shikimato y del acetato (Santos-Sánchez *et al.*, 2019). La estructura química básica del flavonoide es un esqueleto de difenil propano, que contiene quince átomos de carbono (C6-C3-C6) en su núcleo primario: dos anillos de seis miembros unidos con una unidad de tres carbonos que puede o no ser parte de un tercer anillo, y poseen un tercer anillo de pireno que contiene oxígeno heterocíclico (Karak, 2019).

Estos compuestos se encuentran en una gran variedad de alimentos incluida la miel. Se ha reportado que la miel puede prevenir la oxidación de diversos alimentos como frutas, verduras y carnes, siendo los compuestos fenólicos (ácido gálico, ácido ferúlico, ácido elágico, ácido sinrígico, ácido vanílico y ácido cafeico) y flavonoides (kaempferol, quercetina, crisina, pinobanksina, luteolina, apigenina, pinocembrina, genisteina, hesperetina) los principales responsables del efecto antioxidante (Ahmed *et al.*, 2018). Por lo cual, la miel es considerada una fuente rica de antioxidantes (Alvarez-Suarez *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2021).

En la miel de las ASA se han reportado compuestos tipo fenólicos y flavonoides. Un estudio realizado en muestras de miel de *Melipona seminigra* subsp. *merrillae* (Cockerell, 1920) colectada al noreste de Brasil, se reportó la presencia de 14 compuestos fenólicos (Ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vainílico, ácido salicílico, ácido siríngico, ácido cumárico, ácido cinámico, catecol, ácido trans, trans-abscísico, ácido cis, trans-abscísico, taxifolina, naringenina y luteolina) (da Silva *et al.*, 2013).

En Paraíba, Brasil, el análisis de las muestras de miel de *Melipona subnitida* (Ducke, 1911) se detectó la presencia de los flavonoides y fenoles naringenina, quercetina e isorhamnetina, ácido gálico, vainílico, 3,4-dihidroxibenzoico, cumárico y ácido abscísico (trans, trans y cis-trans) (da Silva *et al.*, 2013). Por su parte, Biluca *et al.* (2016) analizaron la composición química de trece muestras de miel de diferentes especies de ASA en el

sur de Brasil; *Melipona bicolor* (Lepeletier, 1836), *Melipona marginata* (Lepeletier, 1836), *Melipona quadrifasciata* (Lepeletier, 1836), *Melipona rufiventris mondory* (Lepeletier, 1836), *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811), *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier, 1836), *Tetragona clavipes* (Fabricius, 1804) y *Tetragonisca angustula angustula* (Latreille, 1811), y se logró identificar la presencia de 26 compuestos fenólicos, 9 flavonoides, una cumarina y dos diterpenos. Los principales compuestos fenólicos fueron ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido rosmarínico, ácido p-cumárico, ácido mandélico, ácido salicílico, aromadendrina, carnosol, eriodictyol, isoquercetrina, naringina, siringaldehído, sinapaldehído, taxifolina, vainillina y umbeliferona.

En la miel de la abeja sin aguijón *M. beecheii*, Ruiz-Ruiz *et al.* (2017), observaron la presencia de 11 compuestos fenólicos y cinco flavonoides en muestras de Mani, Yucatán. Más recientemente, Alvarez-Suarez *et al.* (2018) (**Cuadro 3**).

Lograron identificar 19 compuestos fenoles y flavonoides a partir de muestras de miel de *M. beecheii* colectadas en Cuba De igual manera, estos autores encontraron la presencia de carotenoides, proteínas, ácido fólico, vitamina C y aminoácidos libres en la miel de *M. beecheii*. Por su parte, Sierra *et al.* (2020) mencionan la presencia de tres fenoles y cuatro flavonoides en la miel de *M. beecheii* en Mani, Yucatán (**Cuadro 3**).

Cuadro 3. Compuestos fenólicos identificados en miel de *M. beecheii*.

Compuesto fenólico	Flavonoide	Autor
Ácido cafeico dihidro	C-pentosil-C-hexosil-apigenina	
Ácido cumárico	Isómero de C-pentosil-C-hexosil-apigenina Isómero de C-pentosil-C-hexosil-apigenina Isómero de C-pentosil-C-hexosil-apigenina Deoxihexosil hexósido de quercetina Trihexósido de apigenina Kaempferol desoxihexosil hexósido	Alvarez-Suarez <i>et al.</i> , 2018
	Isorhamnetina desoxihexosil hexósido Quercetina Luteolina Isorhamnetin Quercetina bis-metilada Apigenina Kaempferol Metil luteolina Metil quercetina CD	
Ácido clorogénico	Apigenina	Sierra <i>et al.</i> , 2020
Ácido cafeico	Quercetina	
Ácido elágico	Miricetina Catequina	

CD: Compuesto desconocido

Factores que influyen en la composición física y química de la miel de las abejas sin aguijón

La composición física y química de la miel está relacionada con diferentes factores como: el origen botánico, ubicación geográfica, estacionalidad de la colecta, la especie, nutrición y estado de salud de las abejas (Mohammed *et al.*, 2020).

Origen geográfico y botánico

Cada área o zona geográfica se caracteriza por condiciones climáticas que favorecerán el crecimiento de especies vegetales específicas, sin embargo, en cada área también se pueden generar microambientes que afectan directamente a las especies vegetales y

animales (Mohammed *et al.*, 2020). El origen botánico se considera el factor más importante que influye en las características fisicoquímicas de la miel, ya que el polen, el néctar y las secreciones de las plantas, tienen características físicas y químicas específicas (Mohammed *et al.*, 2020) y, por lo tanto, está directamente relacionado con su contenido de compuestos bioactivos y en su actividad antioxidante y biológica (Shamsudin *et al.*, 2019).

En Brasil, la miel de la abeja *M. seminigra merrillae* fue caracterizada palinológicamente en siete municipios distribuidos en la región centro y sur de la Amazonía brasileña. La miel del centro, presentó un origen monofloral representado por el género *Clidemia* sp. (Melastomataceae) con una frecuencia de 90.96%. De igual manera, las muestras del sur, fueron catalogadas con un origen monofloral representado por el género *Myrcia* sp. (Myrtaceae) con una frecuencia de 77.60%. Estas muestras mostraron un contenido total de fenoles (CTF) de 66 y 64 mg equivalentes de ácido gálico/100g miel (mgGAE/100 g de miel), respectivamente (da Silva *et al.*, 2013).

En Paraíba, Brasil, se analizaron nueve muestras de miel de *M. subnitida* colectada en dos sitios. En el primer sitio, las muestras fueron catalogadas como monoflorales con una dominancia de la especie *Mimosa caesalpiniiifolia* (Benth.) con 95.61% y CTF de 95.7 mgGAE/100g de miel. En el segundo sitio, las muestras resultaron ser multiflorales con una dominancia de la especie *Chamaecrista* sp. (35.17%) y *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir con (20.50%), y un CTF de 166.1 mgGAE/100 g de miel (da Silva *et al.*, 2013).

Por otra parte, Selvaraju *et al.* (2019), compararon la composición palinológica, contenido de fenoles y actividad antioxidante de las muestras de miel de: *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (n=6) y dos especies de ASA: *Geniotrigona thoracica* (Smith, 1857) (n=3) y *Heterotrigona itama* (Cockerell, 1918) (n=6); colectadas en seis diferentes estados de la costa oeste de Malasia. Los resultados mostraron que todas las muestras de *A. mellifera* fueron multiflorales, mientras que, para *G. thoracica* dos fueron multiflorales y una monofloral. Para *H. itama* tres fueron multiflorales y tres monoflorales, predominando la especie *Jacaranda obtusifolia* (Humb. & Bonpl. 1808) en un 75%. Así mismo, las muestras de *H. itama*, fueron las que presentaron el mayor CTF 114.3 mgGAE/100 g de miel, mayor CTFv 13.68 mg catequina (CE)/100g miel y mayor porcentaje de captura de

radicales libres 67.66%. Finalmente, estos autores concluyeron que el origen geográfico y botánico, afectan la composición química y actividad antioxidante de la miel.

Composición fisicoquímica

La composición de la miel de las ASA es diferente a la de *A. mellifera* (Souza *et al.*, 2021). Entre las características fisicoquímicas que se analizan como referencia, para ser usadas como estándares de calidad en la miel, se encuentran: la humedad, el contenido de sólidos solubles totales (SST), el color y el pH.

Humedad

La humedad de la miel, es altamente dependiente de las condiciones ambientales durante la cosecha y almacenamiento. Las ASA presentan un mayor contenido de agua relacionado con la naturaleza de las regiones geográficas donde se encuentran (Nordin *et al.*, 2018). La humedad en la miel se expresa en miligramos por cada 100 g de miel y, generalmente, se determina con un refractómetro. El método con refractómetro se basa en la correlación directa entre el índice de refracción y el contenido de sustancia seca de la miel, lo que permite calcular el porcentaje de agua (Scripca & Amariei, 2018).

El umbral establecido de humedad para considerar una miel de buena calidad en *A. mellifera* es de 20 g/100 g (SADER, 2020). En la miel de ASA dicho umbral puede ser mucho más alto (Vit *et al.*, 2004). Por ejemplo, Nordin *et al.* (2018) detectaron un contenido de humedad de 45.8 g/100 g en la miel de la ASA *Partamona epiphytophila*. Por otro lado, también se pueden encontrar valores por debajo a lo establecido en *A. mellifera*, como Issaro *et al.* (2013) que detectaron un valor de humedad de 13.26 g/100 g en la miel de la ASA *Trigona* sp.

Por otro lado, la humedad en la miel también puede ser medida por su alto grado de viscosidad, el cual está relacionado con el contenido de agua y es expresado en porcentaje (Alvarez-Suarez *et al.*, 2018). En la miel de la ASA *M. subnitida* se encontró una humedad del 27.2% (de Sousa *et al.*, 2016), en tanto que en, *M. beecheii* se encontraron valores de 27.2% y 23.2% (Moo-Huchin *et al.*, 2015; Alvarez-Suarez *et al.*,

2018) (**Cuadro 4**). Por lo tanto, los valores de humedad encontrada en la miel de las ASA son diferentes en comparación con *A. mellifera*.

Sólidos solubles totales

Los sólidos solubles totales en la miel incluyen azúcares, ácidos orgánicos y minerales. El valor de este parámetro revela la relación entre el contenido de agua y azúcar (Biluca *et al.*, 2016). En general, el valor de sólidos solubles en la miel de las ASA es menor en comparación con la miel de *A. mellifera*, debido a que la miel de las ASA presenta un mayor contenido de agua y menor contenido de azúcares (Nordin *et al.*, 2018). Biluca *et al.* (2016) observaron en *M. bicolor* y *M. scutellaris* valores de SST de 64.5 y 75.8 Brix, respectivamente, mientras que en *A. mellifera* valores de 78.77 y 316.92 Brix. Por otro lado, en la ASA *M. subnitida* se encontró 71.1 Brix (de Sousa *et al.*, 2016), y para *M. beecheii* se reportó 75.1 Brix (Moo-Huchin *et al.*, 2015) (**Cuadro 4**).

Color

En función de la escala Pfund (mm), la miel se puede clasificar en los siguientes colores: blanco agua (0-8 mm), extra blanco (8-17mm), blanco (17-34 mm), ámbar extra claro (34-50 mm), ámbar claro (50-84 mm), ámbar (85-114 mm) y ámbar oscuro (mayores de 114 mm) (SADER, 2020). Esta escala es ampliamente aceptada y avalada por el departamento de agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (USDA, por sus siglas en inglés). La coloración de la miel en las ASA es muy variable ya que está relacionada con: el contenido mineral y de polen, origen geográfico y botánico, además, de las prácticas de manejo y producción (Nordin *et al.*, 2018).

Según, Alvarez-Suarez *et al.* (2018) registraron un valor de 37.35 mm Pfund en la miel de *A. mellifera*. Por otro lado, para *M. subnitida* se reportó un valor de 25.6 mm Pfund (de Sousa *et al.*, 2016). En la miel de *M. beecheii* Mo o-Huchin *et al.* (2015) y Alvarez-Suarez *et al.* (2018) registraron valores de 69.9 y 41.65 mm Pfund, respectivamente (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Composición fisicoquímica de la miel de *M. beecheii*

Autor	Alvarez-Suarez <i>et al.</i> , 2018	de Sousa <i>et al.</i> , 2016	Moo-Huchin <i>et al.</i> , 2015	Alvarez-Suarez <i>et al.</i> , 2018
Especie	<i>Am</i>	<i>Ms</i>	<i>Mb</i>	<i>Mb</i>
Parámetros fisicoquímicos				
pH	4.76 ± 0.41	3.10 ± 0.20	3.07 ± 0.20	3.20 ± 0.21
Humedad (%)	16.74 ± 0.38	27.20 ± 0.20	23.20 ± 10	28.62 ± 3.20
Sólidos solubles g/100 g		71.10 ± 0.20	75.10 ± 1.00	
Color (mm Pfund)	37.35 ± 6.52	25.60 ± 0.02	60.90 ± 26.80	41.65 ± 7.68

Am (*A. mellifera*); *Ms* (*M. subnitida*); *Mb* (*M. beecheii*).

pH

El pH se basa en la titulación potenciométrica del contenido de iones de hidrógeno, este parámetro influye en la textura de la miel, la estabilidad y la vida útil (SADER, 2020). En general, las mieles de ASA tienden a ser ácidas (Souza *et al.*, 2021). Marchini *et al.* (1998) reportaron un valor de pH en la miel de *M. scutellaris* de 3.15, en tanto, que Carvalho *et al.* (2009) mostraron un valor de 6.64 en miel de *M. quadrifasciata*, ambas de Brasil. En la miel de *M. beecheii* Moo-Huchin *et al.* (2015) y Alvarez-Suarez *et al.* (2018) reportan los valores 3.07 y 3.2, respectivamente (**Cuadro 4**).

Especie de himenóptero

La composición de la miel varía en relación a la especie de abeja, esto es a razón de que cada tipo de abeja agrega a la miel compuestos específicos como: enzimas, vitaminas, minerales, azúcares, microorganismos etc. (Ahmed *et al.*, 2018). Por lo tanto, dichos compuestos pueden cambiar la composición de la miel bajo ciertos factores, como son, el tiempo y condiciones de almacenamiento, que, aunque la miel puede ser almacenada por largo tiempo, esta puede sufrir ciertos cambios generados por procesos químicos y bioquímicos como son la fermentación, oxidación y deshidratación de azúcares. Algunos de ellos dan lugar a la formación de compuestos como el 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), el cual modifica las propiedades sensoriales y reducen la calidad de la miel (Santos-Buelga *et al.*, 2017).

Con respecto a ello, uno de los constituyentes de la miel que pueden variar dependiendo del tipo de abeja, es el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides. La investigación de Sousa *et al.* (2016) en muestras de miel de las ASA *M. subnitida* y *M. scutellaris* registró un CTF de 1.3-126 mgGAE/100 g de miel y 1.9-4.3 mg de quercetina por 100 g de miel (mgQE/100 g de miel), respectivamente. Por otro lado, Nweze *et al.* (2017) determinaron el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en la miel de las abejas *A. mellifera*, *Hypotrigona* sp. y *Melipona* sp. Estos autores encontraron un mayor contenido de flavonoides y un menor contenido de compuestos fenólicos en la miel de *Melipona* sp. en comparación con la miel de las otras dos abejas (Nweze *et al.*, 2017).

En Brasil, Ávila *et al.* (2019) analizaron el contenido de compuestos fenólicos de mieles de las ASA *M. bicolor*, *M. quadrifasciata*, *M. marginata* y *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier, 1836) y cuantificaron valores de CTF de 708.13, 414.08, 585.34 y 661.14 mgGAE/Kg de miel, respectivamente. Este estudio evidenció que dependiendo de la especie de abeja de procedencia varía la composición química de la miel.

Melisopalinología y su importancia para el análisis floral

La palinología, es una ciencia que se dedica al estudio de los espectros polínicos en diferentes tipos de muestras, que pueden ser sedimentarias, aéreas, contenidas en la miel, etc. (Halbritter, 2018). En ella se compilan una serie de técnicas y metodologías que permiten generar conocimiento acerca de la diversidad morfológica del polen, así como la constancia de dichos caracteres dentro de los taxones (Saenz de Rivas, 1978). Por lo tanto, la palinología analiza los caracteres taxonómicos específicos para las especies vegetales que permiten identificar el origen botánico al que pertenecen (Wodehouse, 1935; Erdtman, 1952; Saenz de Rivas, 1978).

Por otro lado, las mieles tienen características muy particulares en cuanto a color, olor, grado de viscosidad y actividad biológica, dependiendo del origen vegetal del que se colectó el néctar y el polen para su elaboración (Barth, 1989). Para conocer el origen vegetal de una miel, se estudia el polen que contiene, ya que, aunque las abejas digieren y transforman el néctar y el polen de las plantas, la capa de la exina compuesta por esporopolenina queda intacta (Erdtman, 1952; Halbritter *et al.*, 2018). En dicha capa se

encuentran las estructuras y características morfológicas que se emplean para identificar la especie botánica a la que pertenecen los granos de polen, y por ende el recurso floral empleado por la abeja para la elaboración de la miel (Saenz de Rivas, 1978). Por lo tanto, la melisopalinología, es la rama de la palinología encargada de la identificación del polen presente en las mieles (Barth, 1989). Asimismo, permite determinar el origen vegetal en relación a los recuentos totales de polen en las muestras. Este método identifica y cuenta los pólenes en grupos de 100 de acuerdo con los cinco segmentos equidistantes, paralelos al borde superior e inferior del cubreobjetos (Von Der Ohe *et al.*, 2004).

Estudios melisopalinológicos en muestras de miel de *Melipona beecheii*

Al igual que el resto de curcubilados, *M. beecheii* es una especie que se alimenta de néctar y utiliza el polen de las plantas como fuente de proteínas (Michener, 1999). El polen es la principal fuente de proteínas, sustancias grasas, minerales y vitaminas, y es esencial para el crecimiento de las larvas y abejas adultas jóvenes. La crianza de una abeja obrera desde la eclosión hasta la adultez requiere aproximadamente 120 a 145 mg de polen (Jones & Bryant, 2004). *M. beecheii* tiene preferencia por la vegetación madura y poco perturbada. Los hábitos alimenticios de esta ASA han cambiado con la introducción de la abeja africanizada, para evitar competencia (Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2015).

Los estudios melisopalinológicos específicos para la miel de *M. beecheii* han tenido su auge en los últimos años, gracias al interés creciente que se ha tenido en esta especie de abeja sin aguijón. Leal-Ramos & León-Sánchez (2013) registraron en Pinar del río, Cuba, los tipos polínicos *Mimosa pudica* L., *Mimosa pigra* L. y *Bidens pilosa* L., como dominantes en la miel de *M. beecheii*. Otro estudio realizado en Cuba, reportó a *Mimosa pudica*, *Mimosa pigra*, *Bidens pilosa* y *Psidium guajava* L., como las especies dominantes en la miel de *M. beecheii* (Alvarez-Suarez *et al.*, 2018). Esto indica que *M. beecheii* presenta cierto grado de preferencia hacia familias botánicas en función de la zona geográfica.

En México, por su parte Sánchez-Chino *et al.* (2019) observaron a la miel de *M. beecheii* proveniente de Tabasco como monofloral, con una alta dominancia del género *Eugenia*

sp. (72.8%). Asimismo, se encontraron otras especies vegetales como *Lonchocarpus* sp. (5.9%), *Mimosa púdica* (4.3%) y *Zizipus* sp (2.3%). En Soconusco, Chiapas, el análisis de la miel de *M. beecheii* en el 2016 determinó que las especies predominantes fueron *Euphorbia*, *Miconia* y *Euphorbia heterophylla* L. (Lopez-Roblero *et al.*, 2021).

En la Península de Yucatán, Villanueva-Gutiérrez *et al.* (2018) observaron la presencia de *Senna* sp. *Solanum* sp. *Bursera simaruba* (L.) Sarg., *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth, y *Metopium brownei* (Jacq.) Urb. como las especies vegetales más frecuentes encontradas en la miel de *M. beecheii* en el estado de Quintana Roo. En el estado de Campeche, en un estudio melisopalinológico realizado a la miel de *M. beecheii*, se encontraron un total de 11 especies vegetales, sin embargo, las mieles mostraron ser monoflorales con una predominancia del 60% de la especie vegetal *Solanum verbascifolium* Banks. Otras especies representativas encontradas en este estudio fueron *Physalis pubescens* L. y *Solanum lanceolatum* Cav. (Ramírez-Arriaga *et al.*, 2018).

La recopilación de los tipos polínicos encontrados en la miel *M. beecheii* indica que las principales familias visitadas corresponden a Fabaceae, Euphorbiaceae, Myrtaceae y Solanaceae. Asimismo, se reportan un gran número de especies vegetales, sin embargo, aunque se encuentran otros tipos polínicos, estos suelen representar menos del 1% del contenido total, como es el caso de *Nissolia fruticosa* Jacq. y la mayoría de especies reportadas (Ramírez-Arriaga *et al.*, 2018) (**Cuadro 5**). En general las mieles de *M. beecheii* son monoflorales y multiflorales por lo que es necesario mantener un hábitat que brinde áreas de nidificación y la conservación de varias especies vegetales, para tener así una variación en su miel (López-Roblero *et al.*, 2021).

Cuadro 5. Tipos polínicos reportadas en *M. beecheyi*.

Taxón	Taxón	Taxón
Acanthaceae <i>Justicia campechiana</i>	Fabaceae <i>Acacia</i> sp. <i>Bauhinia</i> sp. <i>Caesalpinia</i> sp. <i>Cassia</i> sp. <i>Cercidium praecox</i> <i>Chamaecrista nictitans</i> <i>Desmodium incanum</i> <i>Gliricidia sepium</i> <i>Leucaena leucocephala</i> <i>Lonchocarpus punctatus</i> <i>Lonchocarpus rugosus</i> <i>Lonchocarpus</i> sp. <i>Mimosa bahamensis</i> <i>Mimosa pigra</i> <i>Mimosa púdica</i> <i>Mimosa</i> sp. <i>Nissolia fruticosa</i> <i>Piscidia piscipula</i> <i>Senna pallida</i> <i>Senna racemosa</i> <i>Senna</i> sp.	Passifloraceae <i>Passiflora foetida</i>
Amaranthaceae <i>Alternanthera ramosissima</i> <i>Dysphania ambrosioides</i>		Primulaceae <i>Bonellia macrocarpa</i>
Anacardiaceae <i>Mangifera indica</i> <i>Metopium brownei</i>		Picramniaceae <i>Alvaradoa amorphoides</i>
Arecaceae <i>Chamaedorea seifrizii</i> <i>Roystonea regia</i> <i>Thrinax radiata</i>		Polygonaceae <i>Coccoloba spicata</i> <i>Coccoloba</i> sp . <i>Gymnopodium floribundum</i>
Asteraceae <i>Bidens pilosa</i> <i>Viguiera dentata</i>		Rhamnaceae <i>Zizipus</i> sp.
Begoniaceae <i>Begonia guadiensis</i> <i>Begonia patula</i>		Rutaceae <i>Citrus sinensis</i>
Brassicaceae <i>Brassicasp.</i>	Lamiaceae <i>Salvia officinalis</i>	Salicaceae <i>Casearia emarginata</i>
Bixaceae <i>Cochlospermum vitifolium</i>	Lauráceae <i>Persea americana</i>	Sapindaceae <i>Cupania glabra</i> <i>Serjania racemosa</i> <i>Serjania yucatanensis</i> <i>Thouinia canescens</i>
Bignoniaceae <i>Arrabidaea</i> sp	Malpighiaceae <i>Byrsonima bucidifolia</i>	Sapotaceae <i>Chrysophyllum cainito</i> <i>Chrysophyllum mexicanum</i> <i>Pouteria reticulata</i>
Buddleia <i>Scrophulariaceae</i>	Malvaceae <i>Ceiba pentandra</i> <i>Corchorus siliquosus</i> <i>Euphorbia schlechtendalii</i> <i>Gymnanthes lucida</i> <i>Pseudobombax ellipticum</i>	<i>Pouteria</i> sp. <i>Sideroxylon obtusifolium</i>
Burseraceae <i>Bursera simaruba</i> <i>Bursera</i> sp		Solanaceae <i>Cestrum nocturnum</i> <i>Lycopersicum esculentum</i> <i>Physalis pubescens</i>

Taxón	Taxón	Taxón
Cucurbitaceae <i>Cucurbita argyrosperma</i> <i>Cucurbita pepo</i>	Melastomataceae <i>Miconia</i> sp. <i>Melastomataceae</i>	Solanaceae <i>Solanum americanum</i> <i>Solanum lanceifolium</i> <i>Solanum lanceolatum</i> <i>Solanum</i> sp. <i>Solanum torvum</i> <i>Solanum tuerckheimii</i> <i>Solanum verbascifolium</i>
Euphorbiaceae <i>Bernardia interrupta</i> <i>Croton</i> sp. <i>Euphorbia</i> sp. <i>Hevea brasiliensis</i>	Moraceae <i>Artocarpus altilis</i>	
	Muntingiaceae <i>Muntingia calabura</i>	
	Myrtaceae <i>Eugenia axillaris</i> <i>Eugenia buxifolia</i> <i>Eugenia</i> sp. <i>Myrcianthes fragrans</i> <i>Psidium guajava</i> <i>Psidium sartorianum</i>	Scrophulariaceae <i>Russelia campechiana</i>
		Verbenaceae <i>Havardia albicans</i> <i>Lantana velutina</i>

Autores: Leal-Ramos & León-Sánchez, 2013; Alvarez-Suarez *et al.*, 2018; Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2018; Ramírez-Arriaga *et al.*, 2018; Sánchez-Chino *et al.*, 2019; López-Roblero *et al.*, 2021.

Radicales libres y su asociación con enfermedades

Los radicales libres (RL) son moléculas de bajo peso molecular altamente inestables con al menos un electrón desapareado en su órbita externa, entre los que se encuentran: el radical hidroxilo (OH^\bullet), radical peroxilo (RO^\bullet), anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ácido hipocloroso (HOCl). Los RL se generan en la mayoría de los organismos vivos, como parte del metabolismo del oxígeno (Huberman, 1996). En condiciones fisiológicas normales cumplen diversas funciones como: mediadores de señalización celular, agentes antimicrobianos (estallido respiratorio) y mediadores de la inflamación. Bajo estas condiciones el balance entre la producción y uso de los RL es regulado por el sistema de defensa antioxidante (Valko *et al.*, 2007; Griffiths *et al.*, 2011). Sin embargo, cuando el nivel de agentes oxidantes excede el nivel de defensa antioxidante se desarrolla un proceso conocido como estrés oxidativo (EO), el cual conduce al daño de diversas biomoléculas en la célula. En este entendido, el daño ocasionado al ácido desoxirribonucleico (ADN), conduce a cambios en su estructura generando mutaciones, en tanto que, la reacción con grupos tioles de las proteínas ocasiona alteraciones en la funcionalidad de numerosas enzimas, mientras que, su

acción sobre las membranas lipídicas (ácidos grasos insaturados), conduce a la peroxidación de las mismas (Xie *et al.*, 2016). Finalmente, todo este proceso nocivo ocasiona daño a diversos tejidos, el cual desencadena el desarrollo de enfermedades asociadas a EO como: Alzheimer (Du *et al.*, 2018), diabetes (Pennathur & Heinecke, 2004), fibrosis hepática, cirrosis, entre otras (Loza *et al.*, 2003; Galicia-Moreno & Gutiérrez-Reyes, 2014). En este contexto diversos autores (Sandstrom *et al.*, 1994; Mittler, 2002; Birben *et al.*, 2012) han descrito que los agentes antioxidantes pueden proteger a las células de la oxidación y de esta manera prevenir o revertir el daño ocasionado por el EO.

El sistema de defensa antioxidante

Un antioxidante es una molécula o enzima con la capacidad de neutralizar la acción de un agente oxidante (Avello & Suwaslsky 2006), y de esta manera evitar su efecto nocivo en las células (Piña-Garza, 1996; Venero, 2002). En este entendido, se han descrito dos mecanismos de defensa antioxidante, el primero involucra la participación de enzimas propias de la célula y el segundo moléculas químicas obtenidas de fuente alimenticias.

El sistema de defensa antioxidante de tipo enzimático

El sistema de defensa antioxidante enzimático involucra la acción de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). La SOD tiene como función principal catalizar la dismutación del superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, la CAT es la encargada de catalizar la descomposición del peróxido de hidrogeno (H_2O_2) en oxígeno y agua, mientras que la GPx se encarga de catalizar la oxidación del glutatión reducido (L- γ -glutamil-Lcistenil-glicina; GSH) generando glutatión oxidado (GSH) (McCord & Fridovich 1969; Matés *et al.*, 1999; Matés, 2000; Cao *et al.*, 2003; Valko *et al.*, 2007).

El sistema de defensa antioxidante de tipo no enzimático

Dentro de este grupo se incluyen diversas moléculas químicas, las cual son obtenidas mediante el consumo de productos derivados fuentes naturales, principalmente del reino vegetal; entre los que se incluyen: la vitamina C, el glutatión, los fenoles y flavonoides,

entre otros. En este contexto, se ha descrito que el L-ácido ascórbico o vitamina C, funciona como un agente reductor de diversos RL (H_2O_2 , O_2^- , OH° e hidroperóxidos lipídicos) principalmente en el citosol, sin la necesidad de catálisis enzimática, mientras que en las membranas celulares, se ha descrito que el ácido ascórbico las protege del estrés oxidativo de manera indirecta, reduciendo al radical α -tocoferol a α -tocoferol (Meister, 1994; May, 1999). Mientras que el glutatión (GSH), un tripéptido (Glu-Cis-Gli), actúa como un captador de radicales libre como el $^1\text{O}_2$, O_2^- y HO° , el cual forma un radical tiil que reacciona con una molécula de glutatión oxidada, formando un compuesto denominado glutatión disulfuro (GSSG), este a su vez puede retornar a su forma oxidada (GSH), mediante la acción de la enzima glutatión reductasa (GR) y, de esta manera, continuar con su actividad antioxidante. En tanto que, los fenoles y flavonoides pueden actuar como captadores y estabilizadores de RL, cediendo un electrón de su órbita externa, o mediante la regulación al alza de los mecanismos de transcripción génica encargados de controlar la expresión de la de las enzimas SOD, CAT y GPx. (Torel *et al.*, 1986; Cao *et al.*, 1997; Rice-Evans *et al.*, 1997; Pandey, 2011). Este grupo de moléculas (fenoles y flavonoides) han sido reportados en cantidades abundantes en muestras de miel de ASA (Yao *et al.*, 2003; Nordin *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2021), lo cual podría estar relacionada con la actividad antioxidante de este alimento.

La miel de ASA un alimento rico en fenoles y flavonoides con potencial antioxidante

En los últimos años ha crecido el interés en el consumo de alimentos ricos en antioxidantes, sobre todo con elevado contenido de fenoles y flavonoides (Jiménez *et al.*, 2009; Limón *et al.*, 2010; Cabrera y Match, 2012; Belaya *et al.*, 2019). Unos de estos alimentos es la miel (Battino *et al.*, 2021; Cianciosi *et al.*, 2020), en particular la miel procedente de ASA, ya que se ha demostrado que es mucho más activa en comparación con la de *A. mellifera* (Ávila *et al.*, 2019). En este contexto, Oddo (2008) reportó un mayor potencial antioxidante de la miel de *Trigona carbonaria* colectada en Australia en comparación con las de *A. mellifera*. Asimismo, da Silva *et al.* (2013) mostraron un elevado potencial antioxidante de la miel de *M. seminigra* colectada en el nordeste de Brasil. Por otro lado, Biluca *et al.* (2016) analizaron 33 muestras de miel de 10 especies

de abejas sin aguijón, colectadas en cuatro regiones diferentes de Brasil, encontrando variaciones en cuanto al potencial antioxidante (ensayo de DPPH), de 1.4 a 18.5 mg equivalentes de ácido ascórbico (EAA) por 100 g de miel. En otro estudio, publicado por Silva *et al.*, (2013), se analizaron nueve muestras de miel de *M. subnitida* colectadas en dos regiones semi-áridas de Brasil reportando valores de CTF de 1.1 a 1.2 mgGAE/g de miel, asimismo, estos autores registraron un rango de valores de captura de radicales (ensayo de DPPH) de 10.6 a 12.9 mg mL⁻¹. Por su parte, de Sousa *et al.* (2016) registraron valores máximos de contenido total de flavonoides (CTFv) de 4.2 a 4.4 mgQE/100g miel y valores máximos de porcentajes de captura de RL de 46.9 a 29.5% (ensayo de DPPH) para las muestras de miel de *M. subnitida* y *M. scutellaris* colectadas diferentes regiones de Brasil. Khongkwanmueang *et al.* (2020) reportaron valores de CTF de 100-550 mgGAE/Kg miel, valores de CTFv de 20-150 mgQe/Kg, y capacidad antioxidante con un rango de valores de 15.70-52.07 mg mL⁻¹ para la miel de *Tetragonula laeviceps* colectada en Tailandia. Estos mismos autores concluyen que la actividad antioxidante de la miel depende de la cantidad y tipos de compuestos fenólicos, flavonoides, presentes en la muestra de miel.

En relación a la miel de *M. beecheii*, se han encontrado diferentes valores CTF y CTFv y variación en su actividad antioxidante (**Cuadro 6**). En este contexto, Gutiérrez *et al.* (2009) encontraron un valor de CTF de 107.35 mgGAE/100g y CTFv de 3.60 mgQe/100g miel mientras que, Alvarez-Suarez *et al.* (2018), registraron valores de CTF de 94.39 mgGAE/100g de miel y un CTFv de 4.19 mQE/100g de miel, en muestras colectadas en Cuba. Estos mismos autores reportaron una capacidad antioxidante de 42.23 mmol expresada como equivalentes de trolox (TE)/100 g de miel.

En México, Ruiz- Ruiz *et al.* (2017) cuantificaron un valor CTF de 63.22 mg equivalente de GAE/100 g de miel y CTFV de flavonoides de 3.61 mg equivalentes de catequina/100 g de miel, en muestra colectadas en el estado de Yucatán. Sánchez-Chino *et al.* (2019) mencionaron un CTF 45.42 mgGAE/100g de miel y una capacidad antioxidante de 19 42.23 mmol TE/100 g de miel mediante el ensayo de DPPH. Esto es indicativo de que la variación en el CFT y el CTFv pueden afectar su actividad biológica, probablemente por el origen geográfico donde las muestras fueron colectadas.

Cuadro 6. Contenido de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante reportada en la miel de *M. beecheii*.

	Alvarez- Suarez <i>et al.</i> , 2018	Alvarez- Suarez <i>et al.</i> , 2018	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2009	Ruiz- Ruiz <i>et al.</i> , 2017	Sánchez- Chino <i>et al.</i> , 2019
	Am	Mb	Mb	Mb	Mb
(CFT) (mg Ácido gálico/100 g de miel)	54.30	94.39	107.35	63.22	45.42
(CTFv) (mg Catequina/100 g de miel)	2.68	4.19	3.60	3.61	
Capacidad antioxidante DPPH (μmol TE/100 g de miel)	31.06	42.23	87.38	3.77*	19.00**

Am (*A. mellifera*); Mb (*M. beecheii*); CFT (Contenido fenólico total); CTFv (Contenido total de flavonoides); * (Indica que el valor expresado es el IC₅₀ en mg mL⁻¹); ** (Indica que el valor es expresado en porcentaje).

La miel y sus propiedades citoprotectoras

En el área de investigación y desarrollo de fármacos o alternativas para el tratamiento de enfermedades asociadas al estrés oxidativo como: el cáncer, alzhéimer, fibrosis hepática u otras enfermedades (Aliev *et al.*, 2013), el uso de modelos en líneas celulares es un método fácil, económico y estable, para la obtención de resultados fiables que brindan la oportunidad de investigar la biología y las respuestas farmacológicas preclínicas para ensayos posteriores (Zuiverloon *et al.*, 2018). En la actualidad existen pocos estudios que aborden el efecto citoprotector de las ASA en modelos con líneas celulares, en particular la derivada de *M. beecheii*. Hasta la fecha únicamente se ha encontrado un reporte en la literatura. De acuerdo a los resultados de este trabajo, la miel elaborada por la abeja *Trigona itama*, fue capaz de proteger a las células linfoblastoides de humano (WIL2-NS) contra el daño oxidativo inducido con peróxido de hidrógeno.

CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN DE LOS RECURSOS FLORALES UTILIZADOS POR LA ABEJA SIN AGUIJÓN *MELIPONA BEECHEII* EN DISTINTAS REGIONES DEL ESTADO DE CAMPECHE, MÉXICO

1.1 RESUMEN

La miel de *Melipona beecheii*, ha sido reconocida como parte de la medicina tradicional maya y tiene un gran potencial como alimento natural antioxidante. Sin embargo, se ha descrito que estas propiedades dependen del origen geográfico y de la fuente floral visitada por la abeja. Actualmente, los estudios realizados para identificar los recursos florales utilizados por *M. beecheii* son limitados. Se realizó el análisis melisopalinológico de 16 muestras de miel de la abeja sin aguijón *M. beecheii* de cuatro regiones diferentes del estado de Campeche, México. Se identificaron un total de 69 especies en 24 familias, y la principal familia visitada corresponde a Fabaceae. Con base en el origen botánico, siete muestras se clasificaron como monoflorales y nueve como multiflorales, con predominio de las especies *Bursera simaruba*, *Lonchocarpus longistylus*, *Piscidia piscipula*, *Senna pallida* y *Senna racemosa*. El índice de diversidad de Shannon (2.06-2.55) indicó una diversidad media en recursos florales y el índice de diversidad de Simpson (0.82-0.89) indicó una dominancia media de las especies en las regiones. Los resultados sugieren que *M. beecheii* es poliléctica con algún grado de especialización, pero puede expandir o alterar sus nichos de alimentación dependiendo de la disponibilidad de recursos. Este es el primer reporte del hábito alimentario de *M. beecheii* en diferentes regiones del Estado de Campeche, México.

Palabras clave: Melisopalinología, polen, Campeche, abeja sin aguijón, miel, *Melipona beecheii*.

1.2 ABSTRACT

Melipona beecheii honey has been recognized as part of traditional Mayan medicine and has great potential as a natural food antioxidant. However, it has been described that these properties depend on the geographical origin and the floral source visited by the bee. Currently, the studies carried out to identify the floral resources used by *M. beecheii* they are limited. Melissopalynological analysis of 16 honey samples from the stingless

bee *M. beecheii* from four different regions in the state of Campeche, Mexico was performed. A total of 69 species were identified in 24 families, and the main family visited corresponds to Fabaceae. Based on the botanical origin, seven samples were classified as monofloral and nine as multifloral, with the predominance of the species *Bursera simaruba*, *Lonchocarpus longistylus*, *Piscidia piscipula*, *Senna pallida* and *Senna racemosa*. The diversity index of Shannon (2.06-2.55) indicated a medium diversity in floral resources and the Simpson diversity index (0.82-0.89) indicated a medium dominance of the species in the regions. The results suggest that *M. beecheii* is polylectic with some degree of specialization, but it can expand or alter its feeding niches depending on the availability of resources. This is the first report of the feeding habit of *M. beecheii* in different regions of the State of Campeche, Mexico.

Keywords: Melisopalinology, pollen, Campeche, stingless bee, honey, *Melipona.beecheii*.

1.3 INTRODUCCIÓN

Las abejas sin aguijón son las principales polinizadoras de la flora nativa y de muchos cultivos de importancia comercial en el neotrópico (Roubik, 1995; Quezada-Euán, 2018; Arnold *et al.*, 2018), se estima que, el 80% de la polinización es realizada por las ASA (Ramalho 2004). En esta interacción mutualista, las plantas se reproducen y las abejas obtienen néctar y polen que utilizan para la producción de miel (Van Der Kooi *et al.*, 2021). La miel es un producto natural producido por las abejas a partir del néctar y polen de las plantas, que recolectan y transforman a través de sus secreciones enzimáticas (Ahmed *et al.*, 2018), las cuales depositan, deshidratan y almacenan para su maduración (Codex alimentarius, 2003). Químicamente, la miel se compone principalmente de azúcar (60-85%) y agua (12-23%) (Ahmed *et al.*, 2018) y en menor medida de minerales, vitaminas, aminoácidos, ácidos orgánicos, fenoles y flavonoides. (Santos-Buelga *et al.*, 2017; Quezada-Euán, 2018).

La cultura maya, desde la época prehispánica emplea a las abejas sin aguijón, para la producción de miel (también llamada meliponicultura), de las cuales, *M. beecheii* es la principal especie utilizada para esta actividad (Quezada-Euán, 2018; Ortiz-Vázquez *et*

al., 2016). La miel de *M. beecheii*, se utiliza como remedio para el tratamiento de enfermedades como laringitis, sinusitis, fiebre tifoidea, bronquitis, tos, infecciones bacterianas y cataratas (Ortiz-Vázquez *et al.*, 2016). Se creó que dichas propiedades están relacionadas con las características específicas de esta miel, entre las que encontramos: pH ácido, alto contenido de agua, bajo contenido de azúcar y especialmente, alto contenido de compuestos fenólicos (Souza *et al.*, 2021). Estas características dependen de la vegetación de la cual las abejas recolectan néctar y polen (Ball, 2007). Sin embargo, la vegetación de una región geográfica es el resultado de las condiciones ambientales como la temperatura, características del suelo, altitud y latitud, que, en conjunto, brindan las condiciones necesarias para el establecimiento de diferentes tipos de vegetación (Tivy, 1993; Ceccon *et al.*, 2006). Por tanto, el origen botánico y la región geográfica son factores determinantes en la calidad de la miel (Selvaraju *et al.*, 2019).

En este sentido, el análisis melisopalinológico, es considerado uno de los métodos más fiables para la identificación del origen botánico y geográfico de la miel (Louveaux *et al.*, 1978; Von Der Ohe *et al.*, 2004). Por lo tanto, los estudios melisopalinológicos son de gran importancia para identificar los principales recursos néctar-poliníferos que utilizan las abejas, con la finalidad de mejorar el manejo de las colonias de *M. beecheii*, la producción y calidad de la miel (Guimarães *et al.*, 2019).

En las últimas décadas, la meliponicultura en la Península de Yucatán, específicamente en el estado de Campeche, México creció considerablemente (Quezada-Euán, 2018; Pat-Fernández *et al.*, 2018). Sin embargo, existen pocos estudios melisopalinológicos enfocados en identificar los recursos néctar-poliníferos utilizados por *M. beecheii* para la producción de miel. Sin embargo, en países como Costa Rica (Leal-Ramos & León-Sánchez, 2013) y Cuba (Alvarez-Suarez *et al.*, 2018), se han realizado estudios de melisopalinología enfocados en la especie *M. beecheii*. Mientras que, en México se han realizado trabajos en los estados de Yucatán (Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2018), Tabasco (Sánchez-Chino *et al.*, 2019), Chiapas (López-Roblero *et al.*, 2021) y solo uno en el estado de Campeche (Ramírez-Arriaga *et al.*, 2018) que incluyó un solo sitio de muestreo, por lo que no se considera representativo del estado. Por tanto, el objetivo de esta

investigación es identificar los recursos florales utilizados por *M. beecheii* en muestras de miel en cuatro regiones del estado de Campeche.

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1 Área de estudio

El estado de Campeche, se localiza entre los paralelos 20°50'54", y 17°48'46" de latitud norte, y entre los meridianos 89°07'16" y 92°28'08" longitud oeste. Campeche limita al norte con el Golfo de México y Yucatán; al este con Yucatán, Quintana Roo y Belice; al sur con la República de Guatemala y Tabasco; al oeste con Tabasco y el Golfo de México. El clima predominante es cálido-húmedo en el 92.22% del estado, cálido subhúmedo en el 7.73% del estado (parte oriente) y semiseco muy cálido y cálido en el 0.05% del estado (región norte). La temperatura media anual es de 26 a 27°C y la precipitación anual es de 1 200 y 2 000 mm (INEGI, 2018). Los principales tipos de vegetación son: selva mediana perennifolia, selva mediana subperennifolia y selva mediana subcaducifolia (CONABIO, 2000).

1.4.2 Sitios de colecta de las muestras

Se recolectaron un total de 16 muestras (**Figura 4 y Cuadro 7**) entre los meses de marzo a abril del 2021, en cuatro diferentes regiones del estado Campeche, México. Se colectaron cuatro muestras en la región sureste, siete en la región norte, tres en la región noreste y dos en la región oeste.

La mayor cantidad de muestras se colectó en el norte, debido a que es la zona con mayor actividad melipónica en el estado de Campeche (Pat-Fernández *et al.*, 2018). Las muestras de miel se extrajeron con pipetas Pasteur estériles y se transfirieron directamente a frascos de color ámbar. Las muestras se almacenaron a aproximadamente 8°C hasta su análisis.

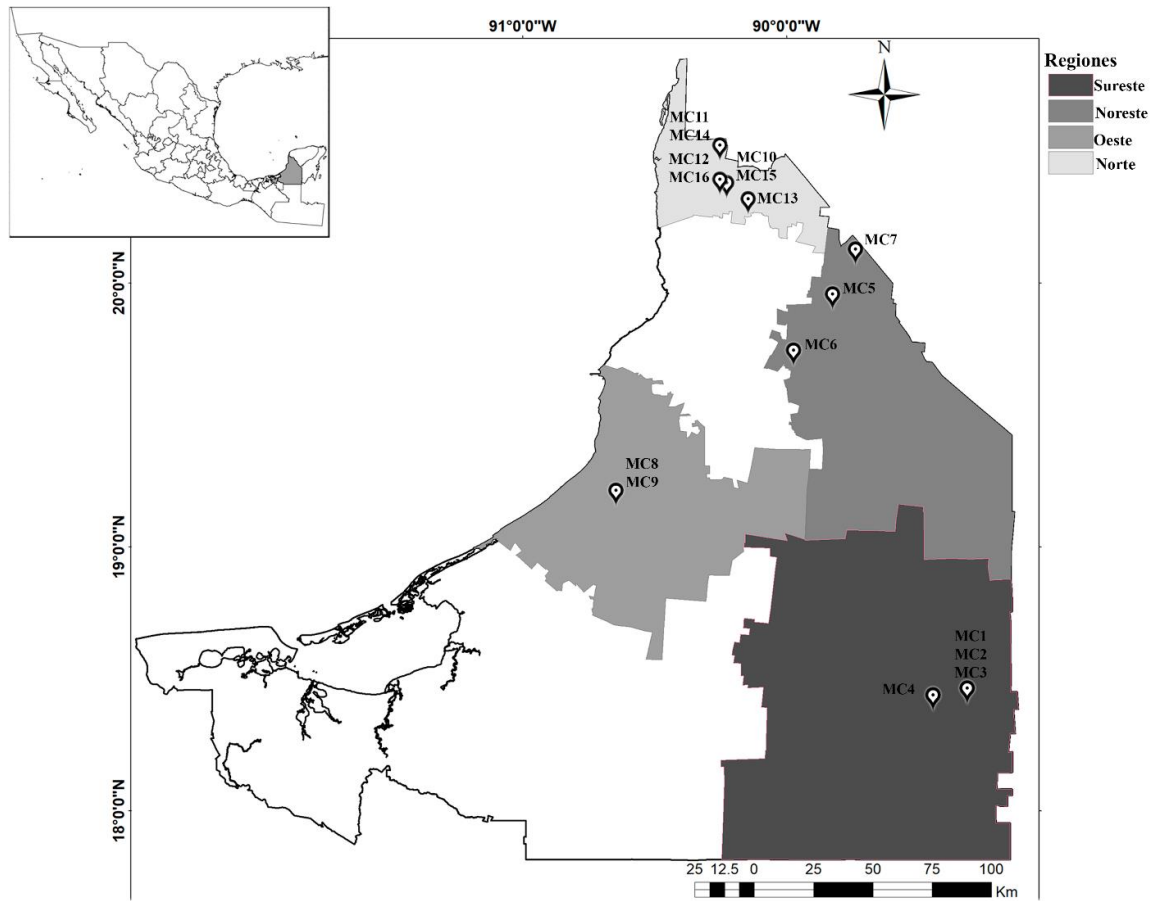


Figura 4. Región geográfica de colecta de las muestras de miel de *M. beecheii*. MC1-MC3: 20 de Noviembre, Calakmul; MC4: la Lucha 1, Calakmul; MC5: Xcalot Akal, Hopelchén; MC6: Ich ek, Hopelchén; MC7: San Antonio, Hopelchén; MC8 y MC9: Sihochac, Champotón; MC10: Pucnachen, Calkiní; MC11: Tankunché, Calkiní; MC12: Santa María, Calkiní, MC13: Sahcabchén, Calkiní; MC14: Tankunché, Calkiní, MC15: Pucnachen, Calkiní, MC16: Santa María, Calkiní.

Cuadro 7. Identificación de los sitios de colecta de las muestras de miel de *M. beecheii* y la vegetación predominante por sitio.

Regiones	Localidad	Muestra	Tipo de vegetación*
Sureste			
	20 de Noviembre, Calakmul	MC1	Selva mediana subperennifolia
	20 de Noviembre, Calakmul	MC2	Selva mediana subperennifolia
	20 de Noviembre, Calakmul	MC3	Selva mediana subperennifolia
	La lucha I, Calakmul	MC4	Selva mediana subperennifolia
Noreste			
	Xcalot Akal, Hopelchén	MC5	Selva mediana subcaducifolia
	Ich ek, Hopelchén	MC6	Selva mediana subcaducifolia
	San Antonio, Hopelchén	MC7	Selva mediana subcaducifolia
Oeste			
	Sihochac, Champotón	MC8	Selva mediana subcaducifolia
	Sihochac, Champotón	MC9	Selva mediana subcaducifolia
Norte			
	Pucnachen, Calkiní	MC10	Selva mediana caducifolia
	Tankuché, Calkiní	MC11	Selva mediana caducifolia
	Santa María, Calkiní	MC12	Selva mediana caducifolia
	Sahcabchén, Calkiní	MC13	Selva mediana caducifolia
	Tankuche, Calkiní	MC14	Selva mediana caducifolia
	Pucnachen, Calkiní	MC15	Selva mediana caducifolia
	Santa María, Calkiní	MC16	Selva mediana caducifolia

*CONABIO, 2000

1.4.3 Análisis palinológico

Las muestras fueron procesadas según la metodología descrita por Jones & Bryant (2004). Brevemente, 10 g de cada muestra de miel fue diluida en 10 mL⁻¹ de agua destilada a una temperatura de aproximadamente 40 °C, se agregó 100 mL⁻¹ de EtOH al 95% y se centrifugó por 5 min a 4000 rpm. Posteriormente, las muestras se sometieron a acetólisis, siguiendo el método de Erdtman (Erdtman, 1960), los granos de polen obtenidos en el sedimento fueron tomados con una pipeta Pasteur y colocados en una lámina con gelatina glicerizada (tres laminillas por muestra) (Kisser, 1935). Los portaobjetos se observaron en microscopio óptico usando el objetivo 40x, (Olympus BX41, Olympus Corporation, Japón), se tomaron fotografías usando una cámara Amscope MU1803 y el software de análisis de imágenes AmScope v.3.7 (AmScope, China). Los granos de polen de las muestras de miel se identificaron a nivel taxonómico

de familia, género o especie. En los casos en que no se pudo determinar, se clasificó como “sp.” no identificada. Los granos de polen se identificaron con base en características morfológicas (polaridad, tamaño, forma, ornamentaciones y número de aperturas) en comparación con la colección palinológica de la diversidad florística de Mesoamérica del departamento de botánica de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), y con diversos catálogos palinológicos (Roubik & Moreno 1991; Palacios-Chávez *et al.*, 1991; Sánchez-Dzib *et al.*, 2009; Alfaro-Bates *et al.*, 2010).

1.4.4 Origen botánico de la miel

Posterior a la identificación de los diferentes tipos polínicos, se contaron 500 granos de polen por muestra de miel, con el fin de determinar la frecuencia relativa de los diferentes tipos o especies de polen. De esta manera, la composición de cada muestra se analizó en términos de (a) frecuencia de polen, (b) predominio por familias y especies (recuentos sumados sobre todas las muestras) y (c) recurrencia de especies (el número de veces que una especie aparece en las muestras, dividido por el número total de muestras) (Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2018). La frecuencia de polen se utilizó para clasificar la dominancia de los tipos polínicos, según Louveaux *et al.*, (1978): polen predominante (>45% del polen total contenido en la muestra de miel), polen secundario (15-45%), polen de menor importancia (3-15%) y polen minoritario (<3%). Las mieles se clasificaron según su origen botánico: (1) monoflorales cuando predominaba una especie con un porcentaje igual o superior al 45%; (2) multifloral cuando se registraron tres o más tipos de polen con porcentajes secundarios (Louveaux *et al.*, 1978). También, se calculó el predominio de las diferentes familias y especies encontradas en las muestras para determinar su importancia, o si existía alguna preferencia entre las diferentes familias. Se calculó la recurrencia para determinar las especies que aparecían en el mayor número de muestras, independientemente de los sitios de muestreo. Finalmente, se clasificaron las diferentes especies según el estrato vegetal (arbóreo, arbustivo o herbáceo).

1.4.5 Análisis ecológicos

El índice de diversidad de Shannon-Wiener (H') se calculó para determinar los recursos florales que *M. beecheii* visita durante el pecoreo. Este índice sugiere, que un valor menor

a 2 es indicativo de diversidad baja, un valor de 2 a 3.5 diversidad media, y un valor mayor a 3.5 diversidad alta (Margalef, 1972). El índice de Simpson (D) se utilizó para medir la riqueza y dominancia de las especies. Este índice, varía de 0 a 1 y define la probabilidad de que dos taxones de una misma muestra, seleccionados al azar, pertenezcan a la misma especie. Donde 0 significa equidad (que existe uniformidad en las especies) y 1 que existe dominancia completa de un taxón (Simpson, 1949). Todo el análisis se realizó utilizando el programa PAST versión 3.16 (da Luz *et al.*, 2019; Pinto *et al.*, 2019; Hanifa *et al.*, 2021; López-Roblero *et al.*, 2021). Adicionalmente, los datos palinológicos se sometieron a un análisis de componentes principales (ACP).

1.5 RESULTADOS

1.5.1 Origen botánico de la miel

Se identificaron un total de 69 tipos polínicos pertenecientes a 24 familias, con 12 tipos indeterminados (**Cuadro 2**). La familia más diversa fue la Fabaceae (15 especies), seguida de la Solanaceae (5 especies), la Asteraceae (4 especies), la Myrtaceae (4 especies), la Sapindaceae (4 especies) y la Burseraceae (3 especies). El cálculo de la frecuencia de polen en el total de las muestras indicó que la familia Fabaceae (encontradas en el 64,4% de las muestras de miel), Myrtaceae (5,57%), Malvaceae (3,22%) y Asteraceae (3,21%) son las más representativas. También, se encontró que en seis muestras, no se pudo determinar botánicamente algunos tipos polínicos y se agruparon en una clase no identificada "sp" (**Cuadro 8**). Por otra parte, de los 69 tipos polínicos, 19 presentaron un hábito de crecimiento arbóreo, 19 herbáceo, 16 arbustivo y 15 no fueron identificados, dichos valores representan el 27.54%, 27.54%, 23.19%, y 21.74% de los recursos florales empleados por *M. beecheii* (**Cuadro 8**).

De las 16 muestras de miel analizadas, siete se clasificaron como monoflorales (MC3, MC4, MC7, MC10, MC11, MC13 y MC14) y las restantes se consideraron como multiflorales (Figura 5). El análisis cuantitativo del polen reveló que los tipos de polen predominantes en todas las muestras fueron *Senna racemosa* (Mill.) H.S. Irwin & Barneby (16.82 %), *Piscidia piscipula* (L.) Sarg. (13.95 %), *Lonchocarpus longistylus* Pittier (11.45 %), *Bursera simaruba* (9.79 %) y *Senna pallida* (Vahl) H.S. Irwin & Barneby (7.11 %). Los

tipos de polen con mayor porcentaje de ocurrencia en las muestras de miel fueron: *L. longistylus* (registrado en el 94% de las muestras), *S. racemosa* (88%), *P. piscipula* (88%), *Mimosa bahamensis* Benth. (81%), *B. simaruba* (88%) y *Eugenia axillaris* (Sw.) Willd. (75%).

Sureste

En total se encontraron de 32 tipos polínicos, pertenecientes a 13 familias. Los recursos con mayor ocurrencia correspondieron a *E. axillaris*, *L. longistylus* y *S. racemosa* (100% encontrado en todas las muestras) (**Cuadro 8**). También se clasificó en esta región dos muestras como monoflorales de *B. simaruba* (MC3) y *P. piscipula* (MC4). Dos muestras fueron multiflorales, una muestra con polen secundario de *Pimenta dioica* (L.) Merr y *P. piscipula* (MC1), y la otra, con polen secundario de *S. racemosa* y *Viguiera dentata* (Cavanilles) Spreng. (MC2) (**Figura 5**).

Noreste

En esta región se registraron 21 tipos polínicos albergados en 12 familias. Los recursos con mayor ocurrencia correspondieron a *B. simaruba*, *Leucaena leucocephala*, *L. longistylus*, *Mimosa bahamensis*, *P. piscipula* y *S. racemosa* (**Cuadro 8**). La clasificación botánica de las muestras reveló una miel monofloral de *S. racemosa* (MC7) y dos mieles multiflorales, una con polen secundario de Boraginacea, *P. piscipula* y *V. dentata* (MC5), y otra con polen de *L. longistylus*, *P. piscipula* y *S. racemosa* (MC6) (**Figura 5**).

Oeste

Se identificaron un total de 7 familias y 16 tipos de polínicos. Los recursos con mayor ocurrencia correspondieron a *B. simaruba*, *E. axillaris*, *L. leucocephala*, *M. bahamensis*, *S. pallida* y *S. racemosa* (**Cuadro 8**). Las dos muestras de esta región se clasificaron como multiflorales, una muestra de Polygonaceae sp., *M. bahamensis* y *S. racemosa* (MC8), y la otra de *S. pallida* y *S. racemosa* (MC9) (**Figura 5**).

Norte

Un total de 14 familias y 37 tipos de polínicos fueron encontrados en las muestras de esta región. Los recursos con mayor ocurrencia correspondieron a *B. simaruba*, *L. longistylus* y *P. piscipula*. De las muestras analizadas en esta región, cuatro se clasificaron como

mieles monoflorales de *S. pallida* (MC10), *L. longistylus* (MC11), *Senna villosa* (MC13) y *P. piscipula* (MC14) (**Cuadro 8**). Además, tres se clasificaron como multiflorales, una muestra con polen secundario de *B. simaruba* y *L. longistylus* (MC12), otra de *L. longistylus*, *S. racemosa* y *Waltheria communis* A.St.-Hil. (MC15); y finalmente, la MC16 con polen secundario de *L. longistylus* y *M. bahamensis* (**Figura 5**).

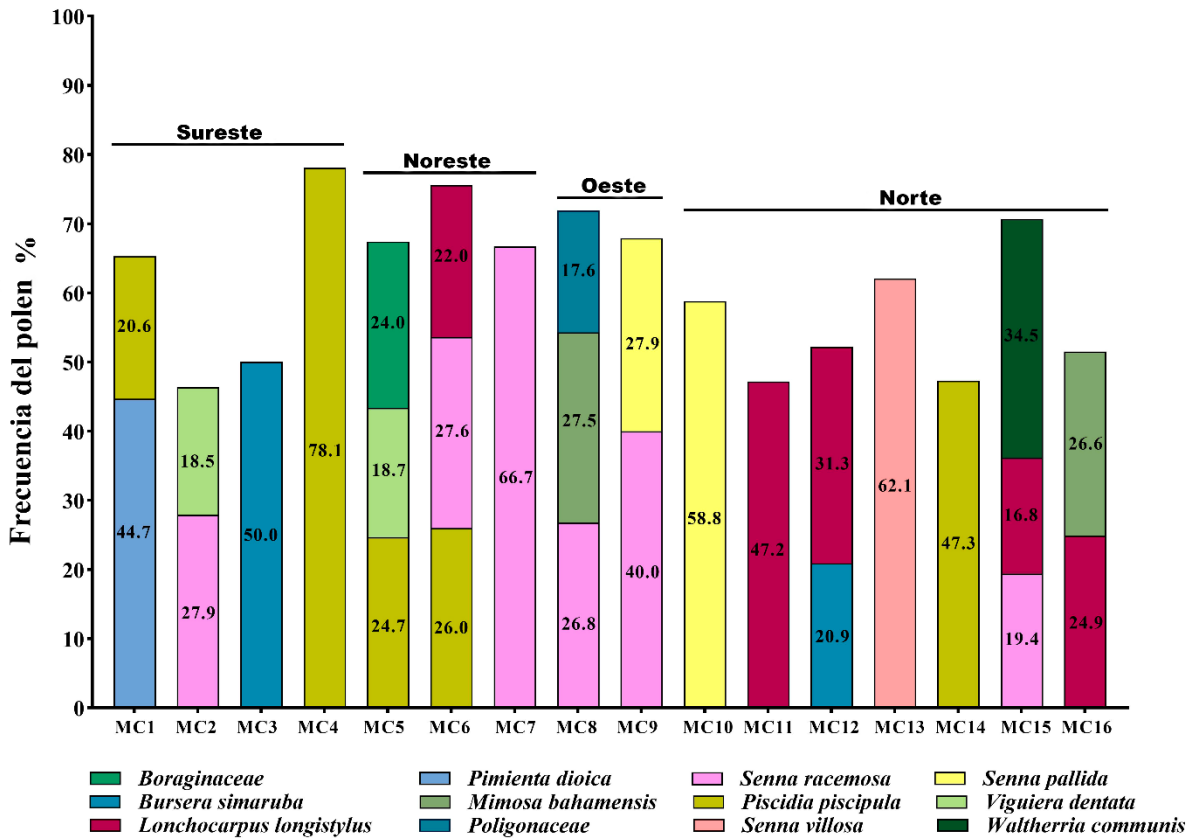


Figura 5. Caracterización de las muestras de miel recolectadas en diferentes regiones de Campeche, México, (monoflorales o multiflorales). Los números en las barras corresponden a los porcentajes de frecuencia de polen en las muestras. Solo se incluyeron los taxones predominantes (> 45%) y secundarios (15-45%).

Cuadro 8. Tipos de polen encontrados en muestras de *M. beecheyi* del estado de Campeche.

Taxones	Nombre en maya	Estrato	MC1	MC2	MC3	MC4	MC5	MC6	MC7	MC8	PR (%)
ACANTHACEAE											
<i>Avicennia germinans</i>	ta'abché	A	-	-	-	-	-	-	-	-	13
AMARANTHACEAE											
<i>Alternanthera ramosissima</i>	zakmuul	H	-	-	-	-	-	11.2	-	-	13
ASTERACEAE											
Asteraceae sp.	-	H	-	-	-	2.3	-	-	-	-	6
<i>Chaptalia nutans</i>	-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	6
<i>Viguiera dentata</i>	Taj (tajonal)	H	7.2	18.5	-	0.8	18.7	1.8	-	-	38
BORAGINACEAE											
Boraginaceae	-	-	-	-	-	-	24	-	-	-	6
BRASSICACEAE											
Arabideae sp.	-	H	-	4	0.2	-	-	-	-	-	13
BURSERACEAE											
<i>Bursera simaruba</i>	Chakaj	A	-	3.4	50	-	0.2	2.4	4.9	5.1	88
<i>Protium copal</i>	Sak chakaj	A	-	9	0.2	-	2	-	-	-	19
CACTACEAE											
Cactaceae sp.	-	H	-	-	-	0.2	-	-	-	-	6
COMBRETACEAE											
<i>Bucida buceras</i>	Pucté	A	-	-	-	0.8	-	-	-	-	6
CONVULVULACEAE											
<i>Ipomea</i> sp.	-	H	-	-	-	0.2	-	-	-	-	6
CYCLANTHACEAE											
<i>Carludovica palmata</i>	Guano	H	-	-	-	-	-	-	-	-	6
EUPHORBIACEAE											
<i>Croton</i> sp.	-	B	-	2.1	18.4	-	-	-	-	-	13
Euphorbiaceae	-	-	-	1.9	-	-	-	-	-	-	6
FABACEAE											

Taxones	Nombre en maya	Estrato	MC1	MC2	MC3	MC4	MC5	MC6	MC7	MC8	PR (%)
<i>Acacia</i> sp.	-	B	-	-	-	-	-	-	-	-	6
<i>Acacia collinsii</i>	Subin	B	-	-	-	-	-	-	-	-	6
<i>Caesalpinia gaumeri</i>	Kitim che'	A	-	-	-	-	2.2	0.6	-	-	13
<i>Gliricidia sepium</i>	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	13
<i>Leucaena leucocephala</i>	Waaxim	A	-	-	-	3.7	1.5	2.6	2.9	4.2	44
<i>Lonchocarpus longistylus</i>	Baal che'	A	3.6	2.3	3.9	1.2	6.4	22	2.9	-	94
<i>Lonchocarpus xuul</i>	K'an xu'ul	A	-	-	-	-	-	-	-	-	13
<i>Mimosa bahamensis</i>	Káatsim blanco	A	-	1.9	4.5	1.2	1.3	1	6.8	27.5	81
<i>Mimosa pigra</i>	Je' beech'	B	-	-	-	-	-	-	-	-	6
<i>Mimosa pudica</i>	Múuts'il xiiw	H	-	-	-	-	-	0.4	-	4.2	50
<i>Piscidia piscipula</i>	Ja'abin	B	20.6	-	-	78.1	24.7	26	1	0.2	81
<i>Senna atomaria</i>	-	A	-	-	-	-	-	-	4.9	-	6
<i>Senna pallida</i>	Ch'iilib mich	B	-	-	-	-	-	-	-	6.4	31
<i>Senna racemosa</i>	K'an lool	A	10	27.9	6.9	-	13.6	27.6	66.7	26.8	88
<i>Senna villosa</i>	Saal che'	B	-	-	-	-	-	-	-	-	19
GESNERIACEAE											
<i>Achimenes palmata</i>	-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	6
MALVACEAE											
<i>Luehea speciosa</i>	K'an kaat	A	-	-	-	0.4	-	-	-	-	6
<i>Waltheria communis</i>	-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	25
<i>Waltheria rotundifolia</i>	-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	19
MELIACEAE											
Meliaceae sp.	-	-	-	-	-	-	-	0.8	-	-	6
MYRTACEAE											
<i>Eugenia Axillaris</i>	-	B	6.5	6.6	7.3	6.3	0.9	-	2.2	0.7	75
<i>Eugenia foetida</i>	Sak loob	A	-	1.5	-	-	-	-	-	-	6

Taxones	Nombre en maya	Estrato	MC1	MC2	MC3	MC4	MC5	MC6	MC7	MC8	PR (%)
<i>Pimienta dioica</i>	Boox pool	A	44.7	-	3.1	0.4	-	-	-	-	19
<i>Psidium guajava</i>	Pichi	B	-	-	-	-	-	-	-	-	6
NICTAGINACEAE											
<i>Pisonia aculeata</i>	Béeb	H	-	-	-	-	-	-	3.9	-	6
ONAGRACEAE											
<i>Ludwigia octovalvis</i>	Máaskab che'	H	2.2	-	-	-	-	-	-	-	19
POLYGONACEAE											
<i>Coccoloba manzanillensis</i>	-	A	-	4.7	-	0.6	-	-	-	-	13
<i>Neomillspaughia emarginata</i>	Sak iitsa'	B	-	-	-	-	-	-	0.4	-	31
Poligonaceae sp.	-	A	0.3	-	-	-	-	-	-	17.6	19
PRIMULACEAE											
<i>Jacquinia aurantiaca</i>	-	B	-	-	-	-	-	-	-	-	6
RUBIACEAE											
<i>Psychotria nervosa</i>	K'aanan	B	-	-	-	-	-	-	-	-	6
SAPINDACEAE											
Sapindacea sp.	-	H	-	13.9	1	-	-	-	-	-	13
<i>Serjania goniocarpa</i>	Chak sik'iix le'	H	-	2.4	-	0.8	-	-	-	-	13
<i>Serjania lundellii</i>	buy aak'	H	-	-	-	0.8	-	2.2	-	-	13
<i>Thouinia paucidentata</i>	k'an chuunup	A	-	-	-	2.3	-	-	-	-	13
SAPOTACEAE											
<i>Sideroxylon foetidissimum</i>	Sibul	A	-	-	-	-	-	1.4	-	-	6
SOLANACEAE											
<i>Cestrum nocturnum</i>	k'an chuunuk	B	-	-	-	-	-	-	-	-	6
<i>Solanacea</i> sp.		B	-	-	-	-	-	-	-	-	65
<i>Solanum lanceifolium</i>	Sikil múuch	H	-	-	-	-	-	-	-	-	13
<i>Solanum lanceolatum</i>	-	B	-	-	-	-	-	-	-	-	6

Taxones	Nombre en maya	Estrato	MC1	MC2	MC3	MC4	MC5	MC6	MC7	MC8	PR (%)
<i>Solanum nudum</i>	Boox kúuts	B	-	-	-	-	-	-	3.3	-	9
<i>Solanum tridynamun</i>	Kóon ya'ax iik	H	-	-	-	-	4.6	-	-	-	6
No identificadas sp.											
sp. 1	-	-	1.2	-	-	-	-	-	-	-	6
sp. 2	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	6
sp. 3	-	-	0.9	-	-	-	-	-	-	-	6
sp. 4	-	-	2.6	-	-	-	-	-	-	-	6
sp. 5	-	-	-	-	3.3	-	-	-	-	-	6
sp. 6	-	-	-	-	1.2	-	-	-	-	-	6
sp. 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	6
sp. 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.6	6
sp. 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
sp. 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
sp. 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
sp. 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
Total			100	100	100	100	100	100	100	100	

Taxones	Nombre en maya	Estrato	MC9	MC10	MC11	MC12	MC13	MC14	MC15	MC16	PR (%)
ACANTHACEAE											
<i>Avicennia germinans</i>	ta'abché	A	-	-	-	-	1	-	0.2	-	13
AMARANTHACEAE											
<i>Alternanthera ramosissima</i>	zakmuul	H	-	-	-	-	-	-	-	0.8	13
ASTERACEAE											
Asteraceae sp.	-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	6
<i>Chaptalia nutans</i>	-	H	-	-	0.6	-	-	-	-	-	6
<i>Viguiera dentata</i>	Taj (tajonal)	H	0.2	-	-	-	-	-	-	-	38
BORAGINACEAE											
			-	-	-	-	-	-	-	-	

Taxones	Nombre en maya	Estrato	MC9	MC10	MC11	MC12	MC13	MC14	MC15	MC16	PR (%)
Boraginaceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
BRASSICACEAE											
Arabideae sp.	-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	13
BURSERACEAE											
<i>Bursera simaruba</i>	Chakaj	A	5.5	0.9	35.4	20.9	0.2	18.6	2.6	7.4	88
<i>Protium copal</i>	Sak chakaj	A	-	-	-	-	-	-	-	-	19
CACTACEAE											
Cactaceae sp.	-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	6
COMBRETACEAE											
<i>Bucida buceras</i>	Pucté	A	-	-	-	-	-	-	-	-	6
CONVULVULACEAE											
<i>Ipomea</i> sp.	-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	6
CYCLANTHACEAE											
<i>Carludovica palmata</i>	Guano	H	-	-	-	-	-	-	0.4	-	6
EUPHORBIACEAE											
<i>Croton</i> sp.	-	B	-	-	-	-	-	-	-	-	13
Euphorbiaceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
FABACEAE											
<i>Acacia</i> sp.	-	B	-	-	-	-	0.2	-	-	-	6
<i>Acacia collinsii</i>	Subin	B	-	-	-	-	-	0.7	-	-	6
<i>Caesalpinia gaumeri</i>	Kitim che'	A	-	-	-	-	-	-	-	-	13
<i>Gliricidia sepium</i>	-	A	-	-	-	6.6	-	-	-	3.4	13
<i>Leucaena leucocephala</i>	Waaxim	A	9	-	-	-	-	-	2	-	44
<i>Lonchocarpus longistylus</i>	Baal che'	A	0.9	19.6	47.2	31.3	1.2	0.2	16.8	24.9	94
<i>Lonchocarpus xuul</i>	K'an xu'ul	A	-	-	-	-	-	-	1.2	0.6	13
<i>Mimosa bahamensis</i>	Káatsim blanco	A	0.9	0.4	-	0.9	5.7	-	3.2	26.6	81

Taxones	Nombre en maya	Estrato	MC9	MC10	MC11	MC12	MC13	MC14	MC15	MC16	PR (%)
<i>Mimosa pigra</i>	Je' beech'	B	-	-	-	-	-	25.6	-	-	6
<i>Mimosa pudica</i>	Múuts'il xiiw	H	0.4	-	-	0.4	1.4	1.3	0.6	7.8	50
<i>Piscidia piscipula</i>	Ja'abin	B	-	2.2	0.9	4.2	4.9	47.3	3.2	10.1	81
<i>Senna atomaria</i>	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	6
<i>Senna pallida</i>	Ch'iilib mich	B	27.9	58.8	15.4	3	-	-	-	-	31
<i>Senna racemosa</i>	K'an lool	A	40	12.1	0.2	1.7	15.8	1.7	19.4	-	88
<i>Senna villosa</i>	Saal che'	B	-	-	-	5.9	62.1	-	6.3	-	19
GESNERIACEAE											
<i>Achimenes palmata</i>	-	H	-	-	-	-	-	-	0.2	-	6
MALVACEAE											
<i>Luehea speciosa</i>	K'an kaat	A	-	-	-	-	-	-	-	-	6
<i>Waltheria communis</i>	-	H	-	-	-	-	5.3	2.2	34.5	7.4	25
<i>Waltheria rotundifolia</i>	-	H	-	-	-	-	1.6	-	1.8	1	19
MELIACEAE											
Meliaceae sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
MYRTACEAE											
<i>Eugenia Axillaris</i>	-	B	1.7	0.4	-	0.8	0.6	-	0.6	-	75
<i>Eugenia foetida</i>	Sak loob	A	-	-	-	-	-	-	-	-	6
<i>Pimenta dioica</i>	Boox pool	A	-	-	-	-	-	-	-	-	19
<i>Psidium guajava</i>	Pichi	B	-	-	0.2	-	-	-	-	-	6
NICTAGINACEAE											
<i>Pisonia aculeata</i>	Béeb	H	-	-	-	-	-	-	-	-	6
ONAGRACEAE											
<i>Ludwigia octovalvis</i>	Máaskab che'	H	-	-	-	-	-	-	1.6	2.6	19
POLYGONACEAE											
<i>Coccoloba manzanillensis</i>	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	13
<i>Neomillspaughia emarginata</i>	Sak iitsa'	B	3.7	-	-	1.5	-	-	1	1.2	31

Taxones	Nombre en maya	Estrato	MC9	MC10	MC11	MC12	MC13	MC14	MC15	MC16	PR (%)
Poligonaceae sp.	-	A	-	1.7	-	-	-	-	-	-	19
PRIMULACEAE											
<i>Jacquinia aurantiaca</i>	-	B	-	-	-	0.4	-	-	-	-	6
RUBIACEAE											
<i>Psychotria nervosa</i>	K'aanan	B	-	3.9	-	-	-	-	-	-	6
SAPINDACEAE											
Sapindaceae sp.	-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	13
<i>Serjania goniocarpa</i>	Chak sik'iix le'	H	-	-	-	-	-	-	-	-	13
<i>Serjania lundellii</i>	buy aak'	H	-	-	-	-	-	-	-	-	13
<i>Thouinia paucidentata</i>	k'an chuunup	A	-	-	-	4.4	-	-	-	-	13
SAPOTACEAE											
<i>Sideroxylon foetidissimum</i>	Sibul	A	-	-	-	-	-	-	-	-	6
SOLANACEAE											
<i>Cestrum nocturnum</i>	k'an chuunuk	B	-	-	-	4.2	-	-	-	-	6
<i>Solanaceae</i> sp.	-	B	-	-	-	12.7	-	-	-	-	65
<i>Solanum lanceifolium</i>	Sikil múuch	H	-	-	-	1.1	-	-	-	6.4	13
<i>Solanum lanceolatum</i>	-	B	-	-	-	-	-	-	4.6	-	6
<i>Solanum nudum</i>	Boox kúuts	B	5.5	-	-	-	-	1.3	-	-	9
<i>Solanum tridynamun</i>	Kóon ya'ax iik	H	-	-	-	-	-	-	-	-	6
No identificadas sp.											
sp. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
sp. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
sp. 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
sp. 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
sp. 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
sp. 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
sp. 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
sp. 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6

Taxones	Nombre en maya	Estrato	MC9	MC10	MC11	MC12	MC13	MC14	MC15	MC16	PR (%)
sp. 9	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	6
sp. 10	-	-	3.7	-	-	-	-	-	-	-	6
sp. 11	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	6
sp. 12	-	-	-	-	-	-	-	1.1	-	-	6
Total			100	100	100	100	100	100	100	100	

Nota: Los números corresponden a la frecuencia relativa, (-) es igual a cero, que es el equivalente a no encontrar grano. Abreviaturas: A, arbóreo; B: Arbustivo; H, herbáceo; PR: porcentaje de recurrenci

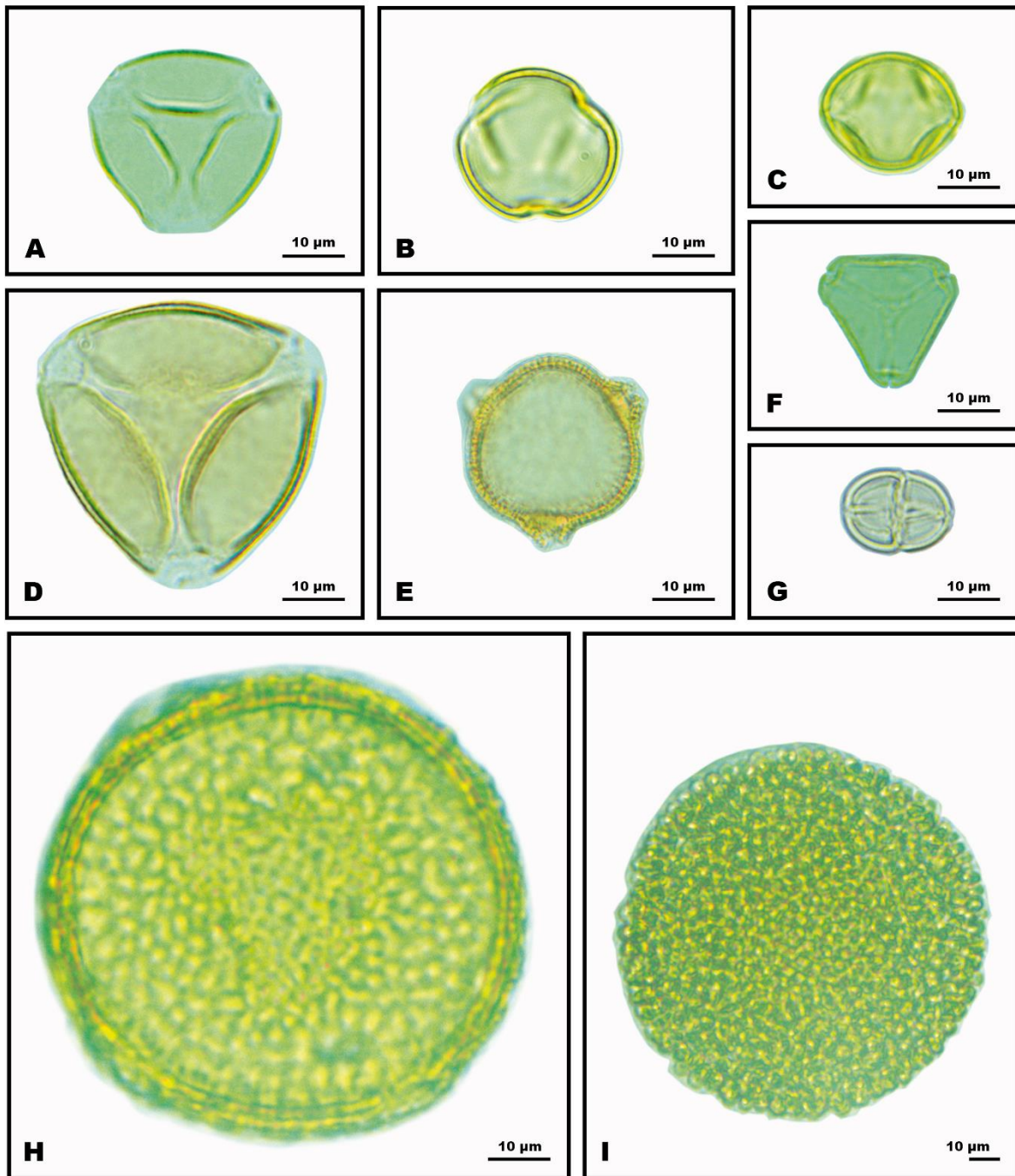


Figura 6. Granos de polen predominantes observados en muestras de mieles de *M. beecheii* de Campeche, México. A) *Senna racemosa*; B) *Lonchocarpus longistylus*; C) *Piscidia piscipula*; D) *Senna villosa*; E) *Bursera simaruba*; F) *Pimienta dioica* G) *Mimosa bahamensis* H) *Waltheria communis*; I) *Croton* sp.

1.5.2 Parámetros ecológicos

El valor del índice de diversidad de Shannon (H') para muestras de miel de *M. beecheii* recolectadas en diferentes regiones mostró valores intermedios (Sureste: 2.51, Noreste: 2.17, Oeste: 2.06 y Norte: 2.55), lo que significa que las abejas visitaron varias especies. Sin embargo, con respecto a los valores del índice de Simpson (D), se registró una mediana dominancia de las especies en las cuatro regiones (Sureste: 0.88, Noreste: 0.82, Oeste: 0.82 y Norte 0.89).

1.5.3 Análisis de Componentes Principales (ACP)

Los resultados del ACP (**Figura 7**) mostraron que el primer componente principal (PC1) y el segundo componente principal (PC2) representaron el 63.79% y el 18.58% de la varianza, respectivamente, y ambos explican el 82.36% de la varianza total, (vectores propios anexo I). El PC1 tiene una mayor dimensión en el biplot, y representan la preferencia global (tipo de polen) de la región geográfica. Mientras que, con relación a PC2 este es ortogonal a PC1, siendo el segundo más preferido. En el biplot, los puntos representan los tipos de polen y los vectores (líneas verdes) para cada región geográfica. El vector en más o menos la misma dirección representa la región geográfica con preferencias similares de tipo de polen.

Con base en PC1, se puede observar que las muestras recolectadas en la región oeste se ubicaron solas, en el lado bajo de PC1 y se caracterizaron por la preferencia del tipo de polen de: *Senna racemosa* (el tipo de polen más frecuente), Poligonacea sp *Senna pallida*, *Mimosa bahamensis*, *Leucaena leucocephala* y *Solanum nudum*. Por otro lado, las muestras colectadas en las regiones noreste y norte, se ubicaron en la parte superior del CP1. El tipo de polen más frecuente en la muestra del norte fue: *B. simaruba*, *L. leucocephala*, *L. longistylus*, *M. bahamensis* y *Piscidia piscipula* mientras que en la región norte *B. simaruba*, *L. longistylus* y *P. piscipula*, fueron los tipos polínicos más frecuentes. Las muestras de la región sureste se ubicaron entre el PC2 (carga principal) y el PC1 y se caracterizó por los tipos de polen de: *B. simaruba*, *Eugenia axillaris*, *L. longistylus*, *P. piscipula*, *Pimienta dioica* y *Viguiera dentata*.

La presencia de *P. dioica* y *Senna villosa* fue una característica distintiva de la muestra del sureste y norte, respectivamente. Las muestras de la región noreste se caracterizaron por la presencia del tipo polínico de: *B. simaruba*, *M. bahamensis*, *P. piscipilua*, *S. racemosa*, y *Viguiera dentata*. También esto se pudo corroborar con el dendrograma obtenido con los tipos de polen más frecuentes de cada región geográfica, ya que este análisis mostró que las cuatro regiones analizadas, se agruparon en dos grupos, con tipos polínicos muy similares dentro de cada grupo pero no con respecto al otro grupo (anexo II). El primer grupo correspondió a las muestras de miel de *M. beecheii* del sureste y norte, y el segundo grupo incluyó a las muestras de la región noreste y oeste.

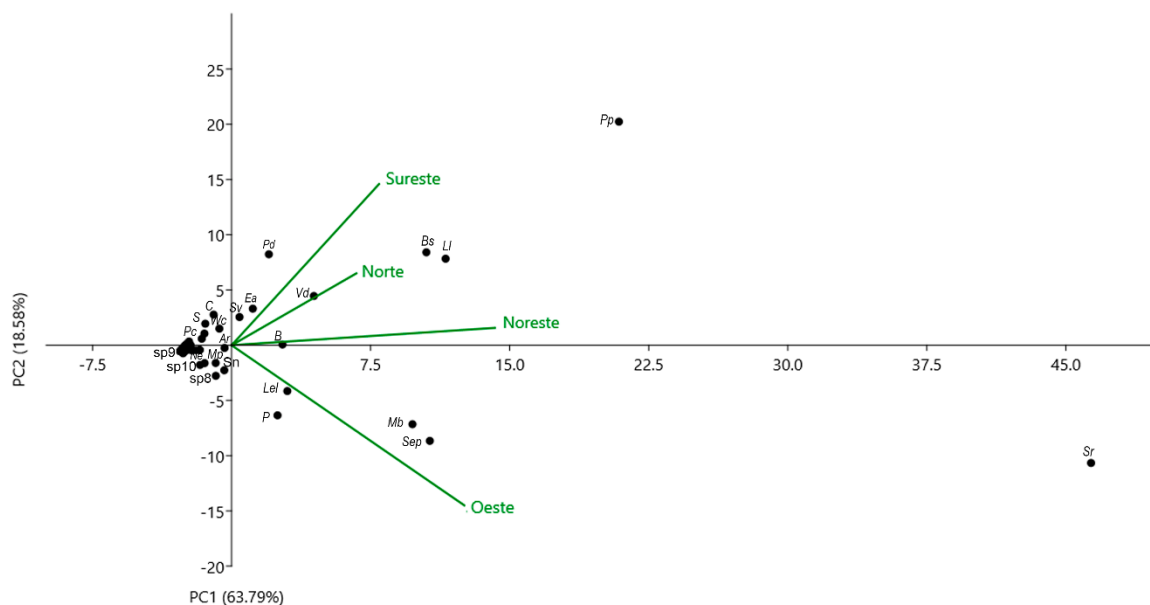


Figura 7. Análisis de componentes principales del origen botánico de la miel de *M. beecheii* del estado de Campeche. Ar) *Alternanthera ramosissima*; B) Boraginaceae sp.; Bs) *Bursera simaruba*; C) *Croton* sp.; ea) *Eugenia axillaris*; leI) *Leucaena leucocephala*; lI) *Lonchocarpus longistylus*; MB) *Mimosa bahamensis*; pf) *Mimosa pudica*; Ne) *Neomillspaughia emarginata*; P) *Poligonaceae* sp.; Pc) *Protium copal*; Pd) *Pimienta dioica*; pp) *Piscidia piscipula*; S) *Sapindaceae* sp.; sep) *Senna pallida*; Sn) *Solanum nudum*; Sr) *Sena racemosa*; Sv) *Sena villosa*; Vd) *Viguiera dentata*; Wc) *Waltheria communis*.

1.6 DISCUSIÓN

El estudio del contenido de polen en muestras de miel de *M. beecheii* permitió determinar un total de 69 tipos de polen pertenecientes a 24 familias. Análisis melisopalinológicos

previos reportaron entre cuatro y 71 tipos de polen en muestras de miel de *M. beecheii* (Leal-Ramos & León-Sánchez, 2013; Alvarez-Suarez *et al.*, 2018; Ramírez-Arriaga *et al.*, 2018; Villanueva-Sánchez *et al.*, 2018; Sánchez-Chino *et al.*, 2019; López-Robledo *et al.*, 2021). Los tipos de polen encontrados en este estudio son similares a los reportados por Leal-Ramos & León-Sánchez, (2013), Alvarez-Suarez *et al.* (2018), Villanueva-Sánchez *et al.* (2018), Sánchez-Chino *et al.* (2019) y López-Robledo *et al.* (2021). Asimismo, se reporta una gran cantidad de especies de plantas, sin embargo, de los 69 tipos de polen, solo 14 de ellos presentaron valores de frecuencia relativa mayor al 15% por lo que se consideran de importancia según Louveaux *et al.* (1978).

En este estudio, por los tipos polínicos encontrados en la miel de *M. beecheii* indica que la principal familia visitada corresponde a Fabaceae. En general, las abejas del género *Melipona* tienen afinidad por las familias Fabaceae, Melastomataceae, Myrtaceae y Solanaceae en diferentes ambientes (Ramalho *et al.*, 1990; Carvalho *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2011; Matos & Santos, 2017). En estudios previos, la familia Fabaceae registró una alta recurrencia en miel de *M. beecheii* (Leal-Ramos & León-Sánchez, 2013; Álvarez-Suarez *et al.*, 2018; Espinoza-Toledo *et al.*, 2018; Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2018; Sánchez-Chino *et al.*, 2019; López-Roblero *et al.*, 2021). Además, de Novais & Absy (2015) notaron la recurrencia de la familia Fabaceae en la miel de la ASA *Tetragonisca angustula*.

Fabaceae es la tercera familia de angiospermas más diversa en el mundo con 19,400 especies y alrededor de 730 géneros (Ahmad *et al.*, 2016). Esta familia es una de las más abundantes en México con 93 géneros y alrededor de 1,274 especies. En la Península de Yucatán 78 géneros y 228 especies (Villaseñor, 2003). En este estudio, los géneros *Lonchocarpus*, *Mimosa*, *Piscidia*, y *Senna* forman parte de la familia Fabaceae y fueron las especies de polen con mayor presencia en las muestras de miel. El género *Mimosa* fue reportado como polen predominante en miel de *M. beecheii* (Leal-Ramos & León-Sánchez, 2013; Alvarez-Suarez *et al.*, 2018; Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2018; Sánchez-Chino *et al.*, 2019; López-Roblero *et al.*, 2021;) y se considera un recurso polínico en la Península de Yucatán (Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2009). El género *Lonchocarpus* ha sido reportado previamente en miel de *M. beecheii* y se considera una fuente de néctar

(Librado-Carranza *et al.*, 2016; Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2018; Sánchez-Chino *et al.*, 2019). Los géneros *Piscidia* y *Senna* reportados por Villanueva-Gutiérrez *et al.* (2018) en miel de *M. beecheii*, se consideran como fuente de néctar y polen en la Península de Yucatán (Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2009). Por lo tanto, podemos inferir que la familia Fabaceae es importante para *M. beecheii* como una fuente de alimento para esta región en México.

Otro tipo de polen predominante en la miel de *M. beecheii* es *B. simaruba*. Villanueva-Gutiérrez *et al.* (2018) reportaron a *B. simaruba* como una especie frecuente en la miel de *M. beecheii* en el estado de Quintana Roo. *B. simaruba* crece en una gran variedad de hábitats y se referencia como recurso de néctar y polen en la Península de Yucatán (Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2009). Los géneros *Bursera*, *Lonchocarpus* y *Piscidia* se consideran abundantes en el estado de Campeche (Zamora-Crescencio *et al.*, 2011; Báez *et al.*, 2012). Estos géneros, pertenecen al estrato arbóreo considerado típico de la selva mediana subperennifolia y perennifolia (Carreón-Santos & Valdez-Hernández, 2014), el cual fue uno de los estratos predominantes en los tipos polínicos encontrados en las muestras de miel de *M. beecheii* (**Cuadro 8**).

En general, los recursos florales encontrados por regiones geográficas indican una diversidad floral media, esto se puede corroborar a partir de los valores promedio del índice de diversidad de Shannon-Wiener (2.06-2.55) (Margalef 1972). Estos resultados son similares a los encontrados por Leal-Ramos & León-Sánchez, 2013, Álvarez-Suárez *et al.* (2018), Villanueva-Gutiérrez *et al.* (2018), Sánchez-Chino *et al.* (2019) y López-Robledo *et al.* (2021). Los valores del índice de Simpson (0,82-0,89) mostraron una mediana dominancia de las especies por regiones. Esto se debe a que el origen botánico fue variable en las regiones según los criterios indicados por Louveaux (1978), se encontró nueve mieles multiflorales y siete monoflorales. De las muestras de miel monoflorales, dos fueron del Sureste, una del Noreste y cuatro del Norte. Análisis previos reportaron una composición monofloral para mieles de *M. beecheii* pertenecientes a *Eugenia* sp., *Andira inermis*, *Mimosa pudica* y *Tabebuia ochracea* (Zamora *et al.*, 2014; Sanchez-Chino *et al.*, 2019; López-Robledo *et al.*, 2021). A diferencia de lo reportado, en este estudio se encontró mieles monoflorales de *B. simaruba* (Sureste), *L. longistylus*

(Norte), *S. racemosa* (Noreste), *S. palida* (Norte), *S. villosa* (Norte) y *P. piscipula* (Sureste y Norte). Estos resultados indican variación en la vegetación por región, sin embargo, el sureste y norte fueron similares ya que se encontró a la especie *P. piscipula* en ambas regiones. Esto se confirma en el ACP, ambas regiones se encontraron en el eje positivo y compartieron algunas especies, como *B. simaruba*, *L. longistylus* y *P. piscipula*. Asimismo, ambas regiones tienen un alto grado de conservación, ya que la región sureste se ubica en áreas adyacentes a la Reserva de la Biosfera de Calakmul (Bohn *et al.*, 2014) y la Norte a la Reserva de la Biosfera de los Petenes (Pat-Fernández *et al.*, 2018). Por el contrario, las regiones Noreste y Oeste se encuentran en áreas agrícolas (Martínez-Vásquez, 2019). También, es interesante notar las diferencias en el origen floral entre los sitios de muestreo, cuando no se registran actividades antrópicas se observa una mayor diversidad de recursos florales y esto se puede corroborar ya que las regiones Sureste y Norte presentaron los valores más altos en el índice de Shannon-Wiener (2.51 y 2.55, respectivamente) en comparación con las regiones Noreste y Oeste (2.17 y 2.06, respectivamente).

Por lo tanto, los resultados obtenidos indicaron que *M. beecheii* es considerada una especie polilectica o generalista como lo reportaron previamente López-Roblero *et al.* (2021). Sin embargo, hay especies constantes en diferentes proporciones en las muestras, tales como *B. simaruba*, *L. longistylus*, *P. piscipula*, *Mimosa* y *Senna*. Esto puede resultar contradictorio, pero según Roubik & Villanueva-Gutiérrez (2009), los generalistas pueden especializarse en cierto grado. Las ASA, aunque son generalistas en la búsqueda de recursos, tienden a visitar constantemente las mismas especies de flores, particularmente aquellas con flores que ofrecen grandes recompensas energéticas (Momose *et al.*, 1998). Esto se puede corroborar, ya que las diferentes regiones presentaron valores medianos en el índice de Simpson, lo que indica una dominancia media de las especies. Además, en este trabajo, *M. beecheii* recolectó una diversidad de plantas de la vegetación nativa, no se encontraron plantas forrajeras cultivadas como lo reportaron previamente Álvarez-Suarez *et al.* (2018) y López-Robledo *et al.* (2021). Esto sugiere una relación estrecha entre *M. beecheii* y la flora nativa

1.7 CONCLUSIÓN

Las mieles de *M. beecheii* colectadas en las cuatro regiones del estado de Campeche, evidencian que visitó diversos recursos florales. Con un total 69 tipos de polen albergados en 24 familias. La principal familia visitada fue la Fabaceae.

Los tipos polínicos más predominantes en todas las muestras fueron *B. simaruba*, *L. longistylus*, *P. piscipula*, *S. pallida* y *S. racemosa*. Sin embargo, *M. beecheii* puede expandir o alterar sus nichos de alimentación, según la disponibilidad de recursos, ya que se encontró una mediana variabilidad de recursos florales por región geográfica, según los valores obtenidos en el índice de diversidad de Shannon-Wiener y en el índice de Simpson. Los resultados encontrados permiten proponer a *M. beecheii* como una abeja poliléctica, debido a sus preferencias florísticas heterogéneas, resultando en mieles monoflorales y multiflorales con preferencia por el estrato arbóreo y herbáceo en la vegetación. La ASA *M. beecheii*, mostró mayor preferencia con la vegetación nativa, lo que evidencia su estrecha relación con la misma.

CAPITULO II. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS, COMPOSICIÓN QUÍMICA, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CITOPROTECTORA DE LA MIEL DE *MELIPONA BEECHEII* DE DIFERENTES REGIONES DEL ESTADO DE CAMPECHE

2.1 RESUMEN

La miel de *Melipona beecheii*, tiene una gran relevancia en la península de Yucatán, especialmente en el estado de Campeche, al ser de gran importancia en la cultura maya por las diversas propiedades medicinales que se le atribuyen (cicatrizante, antibacteriano, antioxidante, etc.). Se analizaron 16 muestras miel de *M. beecheii* de cuatro regiones del estado de Campeche. Se determinaron sus características fisicoquímicas de pH (3.01-3.87), humedad (21.33-28.50%), sólidos solubles (69.17-76.50 Brix) y color (33.82-523.99 mm Pfund). En la composición química se determinó el contenido de fenoles (76.79-736.67 CTF mg GAE/100gmiel), flavonoides (0.27-3.22 CTFv mg QE/100g miel), se cuantificó el contenido de compuestos equivalentes de ácido ascórbico (13.77-116.66 CAEA mg AA/100g miel) y capacidad antioxidante mediante el ensayo DPPH (20.03-168.99 %CRL). En la línea celular Vero se llevó acabo la determinación del efecto citotóxico (105.60-369.10 CC₅₀ mg mL⁻¹, Vero), y la evaluación del efecto citoprotector, el cual se realizó induciendo daño mediante H₂O₂, observando que el efecto citoprotector fue dependiente de la concentración de la miel. Con todo ello se realizó una correlación de Pearson, encontrando una correlación entre los parámetros de color, contenido de fenoles, flavonoides, contenido equivalente de ácido ascórbico, capacidad antioxidante y efecto citoprotector. Se caracterizó el perfil de flavonoides de las muestras MC3, MC7, MC8 y MC12 las cuales resultaron ser las mejores muestras de cada región mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) encontrando naringina, miricetina, luteolina, quercetina apigenina y kaempferol. Las muestras MC8 y MC12 fueron las muestras con mayores valores de color, contenido de fenoles, flavonoides, capacidad antioxidante y efecto citoprotector, también fueron las muestras con mayor variedad y contenido de flavonoides.

Palabras clave: *Melipona beecheii*, líneas celulares, miel, citoprotección, capacidad antioxidante.

2.2 ABSTRACT

Melipona beecheii honey is highly relevant in the Yucatan Peninsula, especially in the state of Campeche, as it is of great importance in the Mayan culture due to the various medicinal properties attributed to it (healing, antibacterial, antioxidant, etc.). Sixteen samples of *M. beecheii* honey from four regions of the state of Campeche were analyzed. Their physicochemical characteristics of pH (3.01-3.87), humidity (21.33-28.50%), soluble solids (69.17-76.50 Brix) and color (33.82-523.99 mm Pfund) were determined. In the chemical composition, the content of phenols (76.79-736.67 CTF mg GAE/100g honey), flavonoids (0.27-3.22 CTFv mg QE/100g honey), the content of equivalent compounds of ascorbic acid (13.77-116.66 CAEA mg AA/100g honey) and antioxidant capacity by DPPH assay (20.03-168.99 % CRL). In the Vero cell line was carried out, the determination of the cytotoxic effect (105.60-369.10 CC₅₀ mg mL⁻¹, Vero), and the evaluation of the cytoprotective effect, which was carried out by inducing damage through H₂O₂, observing that the cytoprotective effect was dependent on the concentration of honey. With all this, a Pearson correlation was carried out, finding a correlation between the parameters of color, content of phenols, flavonoids, equivalent content of ascorbic acid, antioxidant capacity and cytoprotective effect. The flavonoid profile of samples MC3, MC7, MC8 and MC12 was characterized, which turned out to be the best samples of each region by high performance liquid chromatography (HPLC) finding naringin, myricetin, luteolin, quercetin apigenin and kaemferol. The MC8 and MC12 samples were the samples with the highest values of color, phenol content, flavonoids, antioxidant capacity and cytoprotective effect, they were also the samples with the greatest variety and flavonoid content.

Keywords: *Melipona beecheii*, cell lines, honey, cytoprotection, antioxidant capacity.

2.3 INTRODUCCIÓN

La miel es un producto natural producido por las abejas a partir del néctar y la exudación de las plantas que colectan, procesan y transforman mediante sus secreciones enzimáticas (Ahmed *et al.*, 2018). Se han descrito en su composición química aproximadamente 181 compuestos entre ellos: proteínas (0.5%), minerales y vitaminas (0.004-0.2%), enzimas, azúcares (60-85%), agua (12-23%), compuestos volátiles,

fenoles y flavonoides. Así mismo, la miel ha sido usada en la medicina tradicional como remedio para atender problemas de salud como: quemaduras, cataratas, úlceras, diabetes y cicatrización de heridas asociadas a diabetes (Alam *et al.*, 2014; Liyanage & Mawatha, 2017). En la actualidad, diversos estudios han demostrado que los principales responsables del efecto terapéutico de la miel son los compuestos fenólicos (ácido gálico, ácido ferúlico, ácido elágico, ácido sinrígico, ácido vanílico y ácido cafeico) y flavonoides (kaempferol, quercetina, crisina, pinobanksina, luteolina, apigenina, pinocembrina, genisteína, hesperetina), ya que poseen potente actividad antioxidante (Ahmed *et al.*, 2018). De igual manera, se ha descrito que el efecto antioxidante de la miel (asociado a su contenido de fenoles y flavonoides) puede ocurrir de dos maneras, la primera, por una interacción directa de los compuestos antioxidantes con los radicales libres (RL) (proceso conocido como captura de RL) y, la segunda, mediante la modulación del sistema de defensa enzimático celular; cualquiera que sea el mecanismo de acción, este se verá reflejado en una protección de las células ante el daño oxidativo (Ahmed *et al.*, 2018).

En este contexto, el estado de Campeche es una de las principales regiones productoras de miel en México, en particular la miel producida por la ASA *M. beecheii* (Pat-Fernández *et al.*, 2018). La miel de esta ASA, ha sido empleada (desde tiempos de la civilización maya) por los habitantes de esta región del sureste mexicano, como remedio contra enfermedades del sistema respiratorio (tos, laringitis, sinusitis y bronquitis), digestivo (disentería, gastritis y úlceras) y sensorial (cicatrización en la piel e infecciones en la piel, ojos, oídos, boca, lengua, encías y los dientes) (Ocampo-Rosales, 2013; Cauich-Kumul *et al.*, 2015; Ortiz-Vázquez *et al.*, 2016; Quezada-Euán, 2018). Debido a los múltiples efectos benéficos de la miel de *M. beecheii*, en los últimos años, ha habido un creciente interés en determinar su composición química y sus efectos farmacológicos. En este sentido, se ha reportado su actividad antibacteriana (Alvarez-Suarez *et al.*, 2018), antifúngica (Albores-Flores *et al.*, 2018), antiinflamatoria (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2017), principalmente su actividad antioxidante (Zamora *et al.*, 2015; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2017; Alvarez-Suarez *et al.*, 2018). Los reportes de la actividad antioxidante de la miel de *M. beecheii*, se han realizado a partir de extractos orgánicos derivado de ella y no de la miel. De igual forma, gran parte de los ensayos han sido realizados empleando técnicas como: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), capacidad antioxidante para reducir el ion férrico

(FRAP), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) y capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) (da Silva *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2016; Biluca *et al.*, 2017; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2017; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2018). Estos ensayos son de gran utilidad para realizar el tamizaje primario de posibles alimentos y compuestos con potencial antioxidante y proporcionan datos valiosos y útiles. Sin embargo, las evaluaciones en sistemas biológicos ofrecen información más exacta en relación a su posible efecto farmacológico. En este entendido, los modelos murinos y humanos son el sistema ideal para realizar las evaluaciones, a pesar de ello, este tipo de experimentación es costosa y requieren de un tiempo prolongado. Por lo tanto, los modelos en líneas celulares son una opción más económica, relativamente rápida y, además, abordan algunos parámetros farmacológicos, como la absorción, distribución y metabolismo (Liu & Finley, 2005; Wolfe *et al.*, 2007; López-Alarcón *et al.*, 2013; Amorati *et al.*, 2015).

Adicional a lo mencionado, también se ha descrito que la composición química de la miel se encuentra fuertemente relacionado con la especie de abeja, origen geográfico y botánico, lo cual le confiere características muy particulares como son: sabor, olor, color, acides, humedad, y por lo tanto, su efecto terapéutico (Mohammed *et al.*, 2020). En este contexto, el estado de Campeche, tiene la mayor extensión de áreas naturales protegidas después de Baja California Sur (Smardon y Faust, 2006). Cuenta con una gran diversidad de especies vegetales néctar-poliníferas y es una de los estados de mayor producción de miel de *M. beecheii* (Pat-Fernández *et al.*, 2018). Sin embargo, no se encontró evidencia del efecto que pudiera tener el origen geográfico de la miel sobre la composición química, propiedades fisicoquímicas, actividad antioxidante y efecto citoprotector de la miel de *M. beecheii* del estado de Campeche. Por lo que los objetivos de este capítulo del trabajo de tesis fue determinar las características fisicoquímicas de la miel, el contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides, el porcentaje de captura de RL, el efecto citotóxico y la seguridad, el efecto citoprotector y el perfil de compuestos flavonoides de las muestras de miel de *M. beecheii* colectadas en diferentes regiones del estado de Campeche.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1 Colecta de las muestras de miel de *Melipona beecheii*

En total se analizaron 16 muestras de miel de *M. beecheii* provenientes de cuatro regiones del estado de Campeche, México, catalogadas como región sureste, noreste, región oeste y región norte (**Cuadro 7**). Cada una de las muestras fueron tomadas directamente de los nidos utilizando pipetas tipo Pasteur estériles e inmediatamente fueron depositados en tubos de polipropileno estériles. Las muestras fueron transportadas al laboratorio para su resguardo a temperatura ambiente y ausencia de luz hasta su análisis.

2.4.2 Análisis fisicoquímicos

2.4.2.1 Determinación del pH

El pH se determinó con un medidor de pH (HACH sensión+pH3) siguiendo el procedimiento descrito por la Asociación oficial de colaboración analítica internacional, (AOAC por sus siglas en inglés, Asssocation of Official Analytical Collaboration International). Para ello, se pesaron 10 g de cada una de las muestras de miel y se disolvieron en 75 mL⁻¹ de agua destilada usando un agitador magnético, e inmediatamente se midió el pH. Los resultados son expresados como la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes.

2.4.2.2 Contenido de humedad y solidos solubles totales (azúcares)

Ambos parámetros fueron determinados directamente usando un refractómetro portátil, con compensación de temperatura 20°C (ATAGO, ATC-IE, Japan). Los resultados son expresados como la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes.

2.4.2.3 Determinación del color

La escala Pfund fue usada para la determinación del color de la miel. Para ello se preparó una solución acuosa 50% (p/v) de cada una de las muestras de miel y seguidamente fueron centrifugadas a 3200 rpm por 5 minutos. Al sobrenadante obtenido se le determinó

la absorbancia a 635 nm. Las unidades de absorbancia se convirtieron en mm en la escala de Pfund empleado la siguiente ecuación (Albu *et al.*, 2021).

$$\text{Pfund (mm)} = -38.7 + 371.39 \times \text{Abs}$$

En el que Pfund= color de la miel en escala Pfund (mm); Abs= valor de la absorbancia de la muestra a 635 nm.

En función de la escala Pfund la miel puede categorizarse de la siguiente manera: entre 0-8 mm como blanco agua, entre 9-16 mm extra blanco, de 17-34 mm blanco, de 35-50 mm ámbar extra claro, de 51-84 mm ámbar claro y de 84-114 mm ámbar y de 115-140 ámbar oscuro (SADER, 2020).

2.4.3 Análisis de la composición química

2.4.3.1 Determinación del contenido total de fenoles (CTF)

El ensayo se realizó con base a lo descrito por Cao *et al.* (2020) con modificaciones. Para ello 20 µL de una solución de miel (0.1g/ mL⁻¹) previamente filtrada se transfirió en una placa de 96 pozos. Posteriormente, se adicionó el reactivo de Folin-Ciocalteu (1:3 w/v) e inmediatamente se agregó Na₂CO₃ al 7.5%. Por último, se adicionaron 40 µL de agua ultrapura, la mezcla se incubó por 60 min en oscuridad y finalmente, se determinó la absorbancia a 765 nm en un lector de placas. El CTF se estimó mediante la construcción de una curva de calibración usando como estándar ácido gálico (10-100 µg/ mL⁻¹). El CTF fue expresado como miligramos equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de miel usando la siguiente ecuación:

$$\text{CTF} \left(\frac{\text{mgGAE}}{100\text{g}} \right) = \frac{C_{GA} \times V \times \text{DF} \times 100}{\text{peso muestra de miel g}}$$

C_{GA}: concentración de la muestra extrapolada en la curva estándar de ácido gálico (mg mL⁻¹), V: volumen de la solución de miel (mL⁻¹), DF: factor de dilución.

2.4.3.2 Determinación del contenido total de flavonoides (CTFv)

Se utilizó el método de cloruro de aluminio descrito por Harif Fdzilah *et al.* (2017). Para ello, 20 µL de una solución de miel (0.1g/ mL⁻¹) previamente filtrada, fue transferida en

una placa de 96 pozos. Posteriormente, se adicionó cloruro de aluminio al 3% y se incubó por 10 min. Pasado este tiempo, se determinó la absorbancia a 415 nm. Se construyó una curva de calibración usando como estándar quercetina (5-25 µg/ mL⁻¹). Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de quercetina (QE) por 100 g de miel usando la siguiente ecuación:

$$CTFv \left(\frac{mgQE}{100g} \right) = \frac{C_{QE} \times V \times DF \times 100}{\text{peso muestra de miel } g}$$

C_{QE}: concentración de la muestra extrapolada en la curva estándar de quercetina (mg mL⁻¹), V: volumen de la solución de miel (mL⁻¹), DF: factor de dilución.

2.4.3.3 Determinación de la capacidad antioxidante libre de células

Para la determinación de la capacidad antioxidante, se utilizó el ensayo del 2,2-difeil-1-picrilhidrazilo (DPPH) descrito por Chale-Dzul *et al.* (2017). Se tomaron 100 µL de una solución de miel (0.1 g/ mL⁻¹) previamente filtrada, la cual fue transferida en una placa de 96 pozos y se le agregó 100 µL del reactivo DPPH 300 µM y se incubó durante 30 min, finalmente la absorbancia se determinó a 517 nm. Se construyó una curva de calibración usando como estándar ácido ascórbico. Los resultados son expresados como: capacidad antioxidante en miligramos equivalentes de ácido ascórbico (CAEA) por 100 g de miel y como porcentaje de captura de RL empleando las ecuaciones que se describen a continuación:

$$CAEA \left(\frac{mgCAEA}{100g} \right) = \frac{C_{AA} \times V \times DF \times 100}{\text{peso muestra de miel } g}$$

C_{AA}: concentración de la muestra extrapolada en la curva de ácido ascórbico (mg mL⁻¹), V: volumen de la solución de miel (mL⁻¹), DF: factor de dilución.

$$\% \text{ captura de radicales libres} = 1 - \frac{1 - (\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco de muestra})}{\text{Abs reactivo}} \times 100$$

Donde Abs muestra: muestra + DPPH, Abs blanco de muestra: muestra sola, Abs reactivo: solo DPPH.

2.4.3.4 Obtención el extracto rico en flavonoides

La extracción se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Ferreres (1994) y Yao *et al.* (2003) con ligeras modificaciones. Cincuenta gramos de miel fueron mezclados con cinco partes de agua acidulada (pH 2) y disueltos con un agitador magnético a temperatura ambiente, hasta obtener una mezcla fluida, e inmediatamente fue filtrada con algodón para remover las partículas de gran tamaño. El filtrado se mezcló con 100 g de Amberlita XAD-2 (tamaño del poro 9 nm, tamaño de partícula 0.3–1.2 mm) con la ayuda de un agitador magnético durante 10 min. La mezcla con Amberlita se vertió en una columna cromatográfica. La columna fue eluida con 125 mL⁻¹ de agua acidulada, y posteriormente, con 150 mL⁻¹ de agua destilada, para remover azúcares y otros constituyentes polares (Yao *et al.*, 2003). Los flavonoides absorbidos en la columna fueron eluidos con 200 mL⁻¹ de metanol o hasta que la columna no presentará color. La solución metanólica obtenida fue concentrada a presión reducida a 40 °C en un evaporador rotatorio. El extracto concentrado fue resuspendido con 5 mL⁻¹ de agua destilada y fraccionado con éter etílico (5 mL⁻¹) por 3 veces. El extracto obtenido de la fracción etérea fue concentrado y almacenado a 4°C en ausencia de luz hasta ser inyectado en el equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE).

2.4.3.5 Determinación del perfil de flavonoides en las muestras de miel de *M. beecheii*

La determinación del perfil de flavonoides se realizó por CLAE, con base a lo descrito por Cheung *et al.* (2019), con algunas modificaciones. El análisis fue realizado en un equipo Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000, equipado con bomba cuaternaria, automuestreador y arreglo de diodos UV/VIS. La separación cromatográfica se realizó a temperatura ambiente usando una columna Betasil C18 (150 mm x 4.6 mm, 3 µm) acoplada a una precolumna (Zorbax Extended C18, Agilent, 4.6 mm x 12.5, 3.5 µm). Las muestras y los estándares fueron filtrados usando una membrana de nylon de 0.45 µm (Millipore). El volumen de inyección de las muestras (concentración: 100 µg/ mL⁻¹) y la mezcla de estándares (25 µg/ mL⁻¹) fue de 20 µL. Como fase móvil se utilizó una solución de 2.0% (v/v) de ácido acético (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). El perfil de elución inició con 10% de B que posteriormente, incrementó a 30% de 0 a 20 minutos.

Seguidamente el solvente B incrementó a 40% de 20 a 30 minutos y finalmente, a 50% de 30 a 50 minutos. El flujo utilizado fue de 1 mL⁻¹/min. La detección fue realizada a una longitud de onda entre 256 a 350 nm. La presencia de los flavonoides en las muestras fue identificada en comparación con los tiempos de retención de los estándares. Para la cuantificación, se construyó una curva de calibración usando cada uno de los estándares de flavonoides, la cual se construyó a las concentraciones de 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78 µg/ mL⁻¹.

2.4.4 Determinación del efecto citoprotector de las muestras de miel de *M. beecheii*

2.4.4.1 Preparación de las muestras de miel

Previo a la evaluación en líneas celulares, se pesó 1 g de cada una de las muestras de miel de *M. beecheii* y se diluyeron con 1 mL⁻¹ de medio de cultivo sin suero fetal bovino (SFB), seguidamente se filtró con una membrana de nitrocelulosa de 0.22 µM (solución madre). La solución madre fue utilizada para preparar la concentración requerida para los ensayos en líneas celulares.

2.4.4.2 Condiciones estándares de cultivo celular

La evaluación del efecto citoprotector se realizó en la línea celular de riñón de mono verde africano (Vero, ATCC-CCL-81). Para ello las células Vero fueron cultivadas en cajas de cultivo de 75 cm² (Costar) usando Medio Esencial Mínimo (MEM, GIBCO) suplementado con 10% v/v de SFB, 100 U/ mL⁻¹ de penicilina y 100 µg/ mL⁻¹ de estreptomicina, e incubadas 37 °C en una atmosfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad, por un periodo de 24 h o hasta la formación de una monocapa. Las células fueron subcultivadas cada 5 días, empleando una solución de tripsina-EDTA para desprenderlas.

2.4.4.3 Determinación del efecto citotóxico

El efecto citotóxico de las muestras de miel *M. beecheii*, se determinó en la línea celular Vero. Esta línea fue cultivada a una densidad de 5 ×10³ células por pozo en microplacas de 96 pozos e incubadas bajo las condiciones descritas en la sección **2.4.4.2**. Transcurridas las 24 h las células fueron tratadas con concentraciones crecientes (7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125, 250 y 500 mg mL⁻¹) de cada una de las muestras de miel de *M.*

beecheii e incubadas por 48 h. Finalizada la incubación de las células, se determinó el número de células viables, y la concentración citotóxica (CC₅₀) de cada una de las muestras de miel de *M. beecheii* empleando el ensayo de sulforodamina B (SRB).

2.4.4.4 Ensayo colorimétrico de SRB

La SRB es un colorante rosa brillante de aminoxanteno, con capacidad de unirse electrostáticamente a los residuos de aminoácidos de las proteínas. Dicho ensayo determina la viabilidad celular, mediante una relación directamente proporcional entre el número de células vivas y la intensidad del color. La prueba de SRB se realizó de la siguiente manera: posterior al tratamiento de 48 h, se retiró el medio de cultivo a cada una de las placas de 96 pozos y se adicionó, ácido tricloroacético (TCA) al 10% v/v. Posteriormente, se incubó a 4°C por 30 min y finalizado el tiempo, se retiró el sobrenadante y las placas se dejaron secar a temperatura ambiente. Seguidamente, se agregó a cada pocillo SRB (0.1% v/v en ácido acético al 1% v/v), se incubó por 30 minutos, se retiró el sobrenadante, y se realizaron tres lavados con ácido acético al 1%. Finalmente, la tinción se solubilizó usando una solución Tris-Base a 10 mM y se midió la densidad óptica de la disolución a 565 nm en un lector Thermo scientific (Vichai y Kirtikara, 2006). Como control negativo se emplearon células tratadas únicamente con el medio de cultivo y como control positivo se empleó docetaxel. La viabilidad celular se determinó empleando la siguiente formula:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{\text{Abs de la muestra}}{\text{Abs control negativo}} \times 100$$

Los porcentajes de viabilidad celular fueron empleados para realizar los cálculos de la CC₅₀ utilizando el programa GraphPad Prism 9.0.2 Software (USA).

2.4.4.5 Determinación del efecto citoprotector

Las células Vero fueron cultivadas bajo las mismas condiciones descritas en la sección **2.4.4.2**. Posteriormente se transfirieron 5×10^3 células por pozo en microplacas de 96 pozos y se incubaron por 24 h, o hasta alcanzar una confluencia del 80 al 90%. Seguidamente, se reemplazó el medio por medio de cultivo fresco, se añadieron las muestras de miel (12.5 mg mL⁻¹) y se indujo daño oxidativo con peróxido de hidrogeno 10 mM por 3 h.

Posteriormente, se determinó el porcentaje de citotoxicidad mediante el ensayo colorimétrico de SRB y empleando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de citotoxicidad} = 100 - \frac{\text{Abs de la muestra}}{\text{Abs control negativo}} \times 100$$

Como control negativo se emplearon células tratadas únicamente con el medio de cultivo, como control de daño (control positivo) células tratadas con H₂O₂ 10 mM y como control de protección silimarina (Sili) a una concentración de 15.62 µg/ mL⁻¹ + H₂O₂ 10 mM. Cada experimento se realizó por triplicado.

2.4.4.6 Análisis estadísticos

Los resultados se expresaron como la media ± la desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes. El análisis de varianza de una vía (ANOVA) fue empleado para determinar la diferencia de medias entre los parámetros fisicoquímico, químicos, actividad antioxidante y efecto citoprotector de las distintas muestras de miel. La significancia entre las medias fue determinada con una prueba a *posteriori* de Tukey con un nivel de confianza del 95%. Un análisis de correlación bivariado fue empleado para calcular la relación entre los diversos parámetros. Los resultados se expresaron como coeficientes de correlación de Pearson (*r*). La correlación de Pearson es un valor entre -1 y +1 que mide el grado de relación lineal entre dos parámetros. Un valor de correlación positivo, indica una relación lineal positiva (incremento), mientras que un valor negativo indica una relación lineal negativa (disminución). Los valores de CC₅₀ fueron calculados usando curvas de ajuste de dosis respuestas no lineales. El análisis de componentes principales (PCA) fue empleado para clasificar a las muestras de miel con base a sus propiedades fisicoquímica, químicas y actividad antioxidante. Todos los análisis fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism Ver 9.0.2 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA USA). Valores de P < 0.05 fueron considerados significativos.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Análisis fisicoquímicos

2.5.1.1 Valores de pH

Las 16 muestras analizadas presentaron un valor máximo de pH de 3.87 ± 0.02 , en tanto que el valor medio y mínimo fue de 3.46 ± 0.22 y 3.01 ± 0.20 , respectivamente (**Cuadro 9**). Los resultados permitieron observar que la muestra MC3 (monofloral) colectada en la región sureste fue la que presentó el mayor valor de pH, pero no mostró significancia con las muestras MC2, MC9, MC11 y MC12. La muestra con el valor más bajo de pH correspondió a la MC14 (multifloral) colectada en la región norte del estado de Campeche, sin embargo, no presentó diferencias significativas con MC1 y MC5. Por otra parte, considerando las 16 muestras colectadas como el 100%, el porcentaje de muestras con pH alto se distribuyó de la siguiente manera: 12.5% en el sureste, 6.25% en el oeste y 12.5% en el norte. Las muestras con valores de pH bajo se distribuyeron de la siguiente manera: 6.25%, tanto para la región sureste, noreste y norte. En tanto que el porcentaje de distribución de las muestras con pH de las muestras restantes (pH intermedio) se agruparon como se describe a continuación: 6.25% en el sureste, 12.5% en el noreste, 6.25% en el oeste y el 25% en el norte.

2.5.1.2 Contenido de humedad

En relación a los valores de humedad se observó un valor máximo de 28.50 ± 0.00 , un valor promedio de 24.51 ± 2.17 , y un valor mínimo de 21.33 ± 0.29 (**Cuadro9**). En relación a los valores anteriores, se pudo determinar que la muestra con mayor humedad fue la MC14 (monofloral) colectada en la región norte, esta muestra presentó diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en comparación con las 15 muestras restantes. Las muestras MC4 (monofloral) de la región sureste y MC8 (multifloral) colectada en la región oeste, fueron catalogadas con menor humedad, no se observaron diferencias significativas entre ellas, pero si con respecto a las demás muestras. El porcentaje de muestras con alta humedad se distribuyó de la siguiente manera: 6.25% en el norte, humedad baja: 6.25% tanto para el sureste y oeste. Y las muestras restantes (humedad media): 18.75% sureste, 18.75% noreste, 6.25% oeste y 37.5% norte,

2.5.1.3 Sólidos solubles totales (SST)

En relación al contenido SST expresado como grados Brix, se reportó un valor máximo de 76.50 ± 0.00 , en tanto que el valor medio y mínimo osciló entre 73.83 ± 2.19 y 69.17 ± 0.29 , respectivamente (**Cuadro 9**). La muestra MC8 (multifloral) fue la que presentó el mayor contenido de SST, sin embargo, no presentó significancia con la muestra MC2 colectada en el sureste. La muestra MC14 (monofloral) presentó el valor más bajo de SST y fue significativamente diferente en relación a las 15 muestras restantes ($P < 0.05$). El porcentaje de muestras con mayor contenido de SST se distribuyó de la siguiente manera: 6.25% tanto para la región oeste y sureste, contenido bajo: 6.25% para la región norte. El resto de las muestras (contenido medio de azúcar): 18.75% para el sureste y noreste, 6.25% para el oeste y 37.5% para la región norte.

2.5.1.4 Color

Del total de muestras analizadas se observó un valor máximo de 523.99 ± 1.66 , un valor medio y mínimo de 132.56 ± 122.77 y 33.82 ± 1.92 , respectivamente (**Cuadro 9**). En función de los datos anteriores podemos observar que la muestra con mayor color fue la MC12 (multifloral), la cual fue significativamente diferente en relación a las 15 muestras restantes ($P < 0.05$). En tanto que, las muestras MC1 (multifloral) y MC4 (monofloral) presentaron la menor coloración, no observando diferencias significativas entre ambas muestras. El porcentaje de muestras con mayor color se distribuyó de la siguiente manera: 6.25% en la región norte, muestras con menor color quedaron ubicadas en la región sureste, representando el 12.5%. En tanto que, las muestras restantes (color medio) quedaron distribuidas de la siguiente manera: 12.5% en el sureste, 18.75% en el noreste, 12.5% en oeste y 37.5% en la región norte. Adicionalmente, los resultados mostraron que, del total de muestras analizadas 6.25% fue catalogada como blanco (MC1), 18.75% como ámbar extra claro (MC4-MC6), 18.75% ámbar claro (MC10, MC13 y MC14), 18.75% ámbar (MC2, MC15 y MC16) y el 37.5% como ámbar oscuro (MC3, MC7, MC8, MC9, MC11 y MC12) (**Figura 8**).

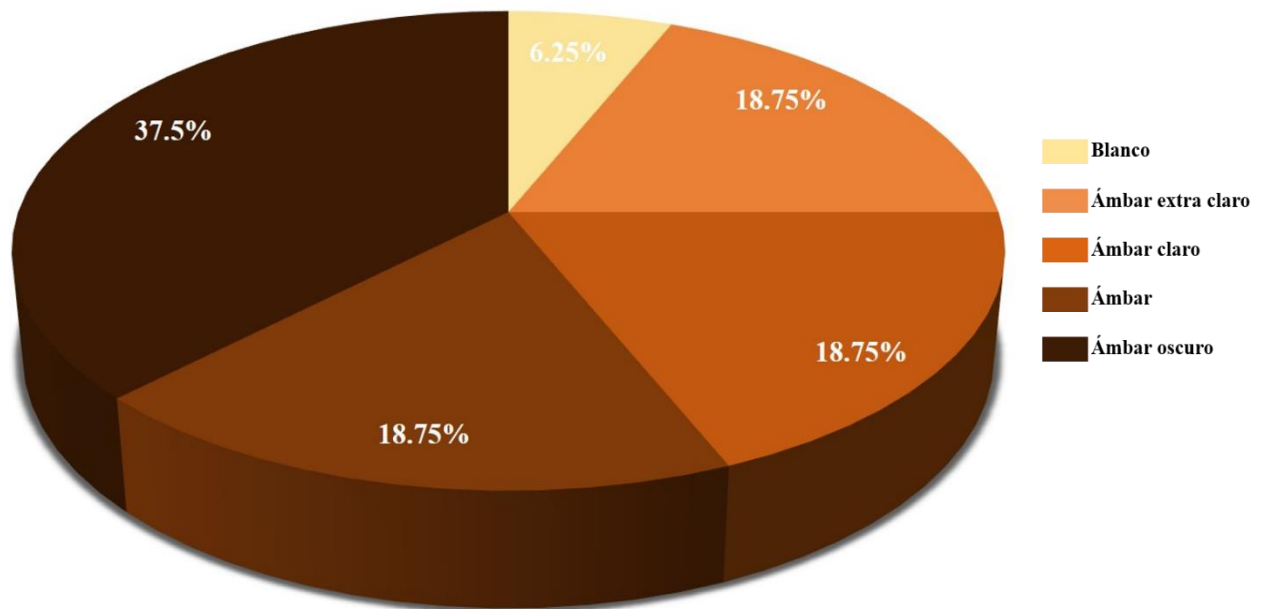


Figura 8. Porcentaje de las muestras de miel de *M. beecheii* clasificadas en función de la escala Pfund.

Cuadro 9. Parámetros fisicoquímicos de la miel de *M. beecheii*, colectada en diferentes regiones del estado de Campeche, México

Región/Localidad	Muestra	pH	Humedad (%)	SST (°Brix)	Color (mm Pfund)
Sureste					
20 de noviembre, Calakmul	MC1 ^{Mu}	3.22 ± 0.02fg	25.17 ± 0.29e	73.17 ± 0.29g	33.82 ± 1.92k
20 de noviembre, Calakmul	MC2 ^{Mu}	3.57 ± 0.02abcde	22.50 ± 0.00h	76.17 ± 0.29ab	95.93 ± 0.96f
20 de noviembre, Calakmul	MC3 ^{Mo}	3.87 ± 0.02a	24.50 ± 0.00f	74.00 ± 0.00f	152.48 ± 1.92e
La lucha I, Calakmul	MC4 ^{Mo}	3.39 ± 0.03cdef	21.33 ± 0.29i	75.00 ± 0.00d	38.81 ± 0.96k
Noreste					
Xcalot Akol, Hopelchén	MC5 ^{Mu}	3.28 ± 0.09efg	23.17 ± 0.29g	75.50 ± 0.00c	47.13 ± 2.54j
Ich ek, Hopelchén	MC6 ^{Mu}	3.34 ± 0.03def	26.17 ± 0.29c	72.00 ± 0.00i	44.36 ± 1.92 j
San Antonio, Hopelchén	MC7 ^{Mo}	3.53 ± 0.11bcde	25.50 ± 0.00de	72.50 ± 0.00h	148.60 ± 0.96e
Oeste					
Sihochac, Champotón	MC8 ^{Mu}	3.55 ± 0.01bcde	21.33 ± 0.29i	76.50 ± 0.00a	229.83 ± 0.27c
Sihochac, Champotón	MC9 ^{Mu}	3.59 ± 0.25abcd	22.50 ± 0.00h	76.00 ± 0.00b	168.01 ± 1.66d
Norte					
Pucnachen, Calkiní	MC10 ^{Mo}	3.55 ± 0.01bcde	23.17 ± 0.29g	75.83 ± 0.29bc	81.51 ± 1.66h
Tankuché, Calkiní	MC11 ^{Mo}	3.75 ± 0.01ab	23.50 ± 0.00g	74.50 ± 0.00e	243.42 ± 0.96b
Santa María, Calkiní	MC12 ^{Mu}	3.66 ± 0.02abc	23.33 ± 0.29g	75.50 ± 0.00c	523.99 ± 1.66a
Sahcabchén, Calkiní	MC13 ^{Mo}	3.36 ± 0.05def	27.00 ± 0.00b	71.00 ± 0.00j	83.17 ± 0.96g
Tankuche, Calkiní	MC14 ^{Mo}	3.01 ± 0.20g	28.50 ± 0.00a	69.17 ± 0.29k	55.45 ± 1.66hi
Pucnachen, Calkiní	MC15 ^{Mu}	3.40 ± 0.17cdef	26.00 ± 0.00cd	73.50 ± 0.00g	87.61 ± 1.92g
Santa María, Calkiní	MC16 ^{Mu}	3.51 ± 0.02bcdef	27.00 ± 0.00b	71.00 ± 0.00j	94.82 ± 2.54f
Promedio		3.46	24.51	73.83	132.56
Máximo		3.87	28.50	76.50	523.99
Mínimo		3.01	21.33	69.17	33.82
Desv.est		0.22	2.17	2.19	122.77

SST: sólido solubles totales; Mo: monofloral; Mu: multifloral con predominancia de. MC1: *Pimenta dioica* y *Piscidia piscipula*; MC2: *Senna racemosa* y *Viguiera dentata*; MC3: *Bursera simaruba*; MC4: *Piscidia piscipula*; MC5: *Piscidia piscipula* y *Viguiera dentata*; MC6: *Senna racemosa* y *Lonchocarpus longistylus*; MC7: *Senna racemosa*; MC8: *Mimosa bahamensis* y *Senna racemosa*; MC9: *Senna racemosa* y *Senna pallida*; MC10: *Senna pallida*; MC11: *Lonchocarpus longistylus*; MC12: *Bursera simaruba* y *Lonchocarpus longistylus*; MC13: *Senna villosa*; MC14: *Piscidia piscipula*; MC15: *Waltheria communis*, *Senna racemosa* y *Lonchocarpus longistylus*; MC16: *Mimosa bahamensis* y *Lonchocarpus longistylus*. Medias con la misma letra por columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha = 0.05$).

2.5.2 Análisis Químico

2.5.2.1 Contenido total de fenoles (CTF)

En relación al contenido total de fenoles expresado como mg de ácido gálico /100g de miel, se observó un valor máximo de 736.67 ± 4.17 , un valor medio y mínimo de 232.01 ± 186.16 y 76.79 ± 1.06 , respectivamente (**Cuadro 10**). La muestra con el mayor CTF correspondió a la MC12 (multifloral) mostró diferencia estadística significativa en relación a las 15 muestras restantes ($P < 0.05$). En tanto que las muestras MC1 (multifloral), MC4 (monofloral), MC5 (multifloral) y MC6 (multifloral) presentaron los valores más bajos de CTF, no se observaron diferencias estadísticas significativas entre ellas. El porcentaje de muestras con mayor CTF se encontró en la región norte y representó el 6.25%, en tanto que el porcentaje de las muestras con valor bajo de CTF quedaron distribuidos de la siguiente manera: 6.25% en sureste y 12.5% en el noreste. Las muestras restantes consideradas con valores medios CTF se distribuyeron de la siguiente manera: 18.75 % en el sureste, 6.25% en oeste, 12.5% oeste y 37.5% en el norte.

2.5.2.2 Contenido total de flavonoides (CTFv)

En relación al contenido total de flavonoides expresado como mg de quercetina /100g de miel, se observó un valor máximo de 3.32 ± 0.41 , un valor medio y mínimo de 0.94 ± 0.72 y 0.27 ± 0.01 , respectivamente (**Cuadro 10**). La muestra con el mayor CTFv correspondió al MC12 (multifloral) y fue estadísticamente significativa en relación a las 15 muestras restantes ($P < 0.05$). En tanto que, las muestras MC1 (multifloral), MC2 (multifloral), MC4 (monofloral), MC5 (multifloral), MC6 (multifloral), MC9 (multifloral), MC10 (monofloral), MC14 (monofloral), presentaron los valores más bajos de CTFv, no presentaron diferencias significativas entre ellas. La muestra con el mayor CTFv se ubicó en la región norte y representó el 6.25%, en tanto que, el porcentaje de muestras los valores más bajos de CTFv quedaron distribuidos de la siguiente manera: 18.75% en el sureste y 12.5% en el noreste. 6.25% en oeste y 12.5% en el norte. Las muestras restantes, consideradas con valores medios se distribuyeron de la siguiente manera: 6.25% tanto para el sureste, noreste y oeste, y 25% en el norte.

2.5.2.3 Capacidad antioxidante

En relación a la capacidad antioxidante expresada como equivalentes de ácido ascórbico/100g de miel (CAEA), se registró un valor máximo de 116.66 ± 0.91 un valor medio y mínimo de 43.33 ± 27.34 y 13.77 ± 1.33 , respectivamente (**Cuadro10**). La muestra con el mayor CAEA correspondió a la MC12 (multifloral) y presentó diferencia estadísticamente significativa con relación a las 15 muestras restantes ($P < 0.05$). Las muestras MC1 (multifloral), MC4 (monofloral), MC5 (multifloral) y MC6 (multifloral) presentaron los valores más bajos de CAEA, no mostraron diferencias significativas entre ellas. La muestra con el mayor CAEA se encontró en la región norte y representó el 6.25%, en tanto que, el porcentaje de muestras con valores bajos CAEA quedaron distribuidos de la siguiente manera: 12.5% tanto para el sureste y el noreste. Las muestras con valores medios de CAEA se distribuyeron de la siguiente manera: 12.5% en la región sureste, 6.25% en el noreste, 12.5% en el oeste y 37.5% en el norte.

2.5.2.4 Porcentaje de captura de radicales libres

Con relación al porcentaje de captura de radicales libres (CRL) se observó un valor máximo de 168.99 ± 2.90 y un valor medio y mínimo de 59.79 ± 38.92 y 20.03 ± 0.11 , respectivamente (**Cuadro10**). La muestra con el mayor porcentaje de CRL fue nuevamente la MC12 (multifloral) y fue diferente estadísticamente con relación a las 15 muestras restantes ($P < 0.05$). Las muestras MC1 (multifloral), MC4 (monofloral), MC5 (multifloral) y MC6 (multifloral) presentaron los porcentajes más bajos de CRL, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas. La muestra con el mayor porcentaje de CRL se encontró en la región norte y representó el 6.25%, en tanto que, el porcentaje de muestras valores bajos de CRL quedaron distribuidos de la siguiente manera: 12.5% tanto para el sureste y el noreste. Mientras que, las muestras restantes (valores medios de CRL) se distribuyeron de la siguiente manera: 12.5% en la región sureste, 6.25% en el noreste, 12.5% en el oeste y 37.5% en el norte, y finalmente, con la intención de determinar la relación entre los parámetros: color, CTF, CTFv, CAEA y CRL, se realizó el análisis de correlación lineal de Pearson (**Cuadro11**).

Cuadro 10. Contenido de fenoles, flavonoides y efecto antioxidante de la miel de *M. beecheii* del estado de Campeche, México.

Región/Localidad	Muestra	CTF mg GAE/100gmiel	CTFv mg QE/100g miel	CAEA mg AA/100g miel	CRL %
Sureste					
20 de noviembre, Calakmul	MC1 ^{Mu}	76.79 ± 1.06i	0.58 ± 0.05e	16.40 ± 1.31g	24.73 ± 1.30g
20 de noviembre, Calakmul	MC2 ^{Mu}	187.21 ± 2.87g	0.37 ± 0.02e	32.94 ± 1.86e	43.82 ± 1.57e
20 de noviembre, Calakmul	MC3 ^{Mo}	293.53 ± 8.95d	1.21 ± 0.12bcd	51.63 ± 0.94d	68.13 ± 1.30d
La lucha I, Calakmul	MC4 ^{Mo}	80.83 ± 3.06i	0.27 ± 0.01e	14.55 ± 1.56g	20.03 ± 0.11g
Noreste					
Xcalot Akol, Hopelchén	MC5 ^{Mu}	80.71 ± 2.22i	0.56 ± 0.01e	13.77 ± 1.33g	20.24 ± 1.57g
Ich ek, Hopelchén	MC6 ^{Mu}	79.00 ± 2.78i	0.36 ± 0.04e	16.03 ± 2.13g	21.58 ± 2.55g
San Antonio, Hopelchén	MC7 ^{Mo}	253.20 ± 1.20e	1.06 ± 0.09cd	47.97 ± 1.70d	64.52 ± 2.77d
Oeste					
Sihochac, Champotón	MC8 ^{Mu}	471.44 ± 4.62c	1.11 ± 0.06cd	82.37 ± 1.44b	117.18 ± 2.18b
Sihochac, Champotón	MC9 ^{Mu}	192.43 ± 1.84g	0.48 ± 0.04e	47.72 ± 2.13d	62.65 ± 2.96d
Norte					
Pucnachen, Calkiní	MC10 ^{Mo}	119.07 ± 3.90h	0.41 ± 0.04e	33.45 ± 1.52e	43.85 ± 0.83e
Tankuché, Calkiní	MC11 ^{Mo}	488.10 ± 5.39b	1.36 ± 0.22bc	47.91 ± 1.15d	62.57 ± 1.57d
Santa María, Calkiní	MC12 ^{Mu}	736.67 ± 4.17a	3.22 ± 0.41a	116.66 ± 0.91a	168.99 ± 2.90a
Sahcabchén, Calkiní	MC13 ^{Mo}	110.49 ± 1.93h	1.08 ± 0.10cd	32.37 ± 1.73e	45.19 ± 1.02e
Tankuche, Calkiní	MC14 ^{Mo}	118.94 ± 1.22h	0.59 ± 0.04e	27.39 ± 1.69f	36.28 ± 2.18f
Pucnachen, Calkiní	MC15 ^{Mu}	217.08 ± 0.60f	1.46 ± 0.14b	63.38 ± 0.29c	76.45 ± 2.32c
Santa María, Calkiní	MC16 ^{Mu}	206.66 ± 0.60f	0.95 ± 0.06d	48.65 ± 1.45d	64.39 ± 1.95d
Promedio		232.01	0.94	43.33	59.79
Máximo		736.67	3.22	116.66	168.99
Mínimo		76.79	0.27	13.77	20.03
Desv.est		186.16	0.72	27.34	38.92

Mo: monofloral; Mu: multifloral; CTF: contenido total de fenoles; CTFv: Contenido total de flavonoides; CAEA: Capacidad antioxidante equivalentes de ácido ascórbico; CRL: Captura de radicales libres; GAE: Ácido gálico, QE: Quercetina; AA: Ácido ascórbico. Medias en la misma columna y que comparten la misma letra son estadísticamente significativas $P < 0.05$ Medias con la misma letra por columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha = 0.05$).

Los resultados mostraron una fuerte correlación ente el color y el CTF ($r=0.958$. $P<0.001$), CTFv ($r=0.884$. $P<0.001$), CRL ($r=0.920$. $P<0.001$) y el CAEA ($r=0.898$. $P<0.001$). Entre el CTF y el CTFv ($r=0.865$. $P<0.001$), CRL ($r=0.920$. $P<0.001$) y CAEA ($r=0.898$ $P<0.001$), de igual manera para CTFv con el CRL ($r=0.881$. $P<0.001$) y el CAEA (**Cuadro 11**). Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre el color, CTF, CTFv, CRL, CAEA y CP, de las muestras de miel de *M. beecheii*, colectadas en diferentes regiones del estado de Campeche ($r=0.874$ $P<0.001$) y finalmente, entre el CRL y el CAEA ($r=0.995$ $P<0.001$).

Cuadro 11. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre el color, CTF, CTFv, CRL, CAEA y CP, de las muestras de miel de *M. beecheii*, colectadas en diferentes regiones del estado de Campeche

Parámetros	Color	CTF	CTFv	CRL	CAEA	CP
Color	1.000					
CTF	0.959***	1.000				
CTFv	0.884***	0.865***	1.000			
CRL	0.920***	0.920***	0.881***	1.000		
CAEA	0.898***	0.909***	0.874***	0.995***	1.000	
CP	0.636**	0.725***	0.544*	0.684**	0.709**	1.00

CTF: contenido total de fenoles; CTFv: contenido total de flavonoides; CRL: captura de radicales libres (%); CAEA: capacidad antioxidante en equivalentes de ácido ascórbico; CP: citoprotección. *** $P<0.001$; ** $P<0.01$; * $P<0.05$.

2.5.3 Determinación del efecto citoprotector (CP) de las muestras de miel de *M. beecheii*

2.5.3.1 Determinación del efecto citotóxico

El efecto citotóxico es indeseable, cuando un extracto o alimento como la miel pretende ser empleado a futuro como un nutraceutico (citoprotector). Con la finalidad de descartar dicho efecto, las 16 muestras de miel de *M. beecheii* colectadas en diferentes regiones del estado de Campeche fueron evaluadas en la línea celular Vero. Las 16 muestras de miel *M. beecheii* mostraron una reducción de la viabilidad celular dependiente de la concentración, observándose un efecto máximo a 500 mg mL^{-1} , en tanto que, el mayor porcentaje de células vivas (mayor del 90%) se observó entre el rango de concentraciones de 7.81 y 15.62 mg mL^{-1} (**Figura 9**).

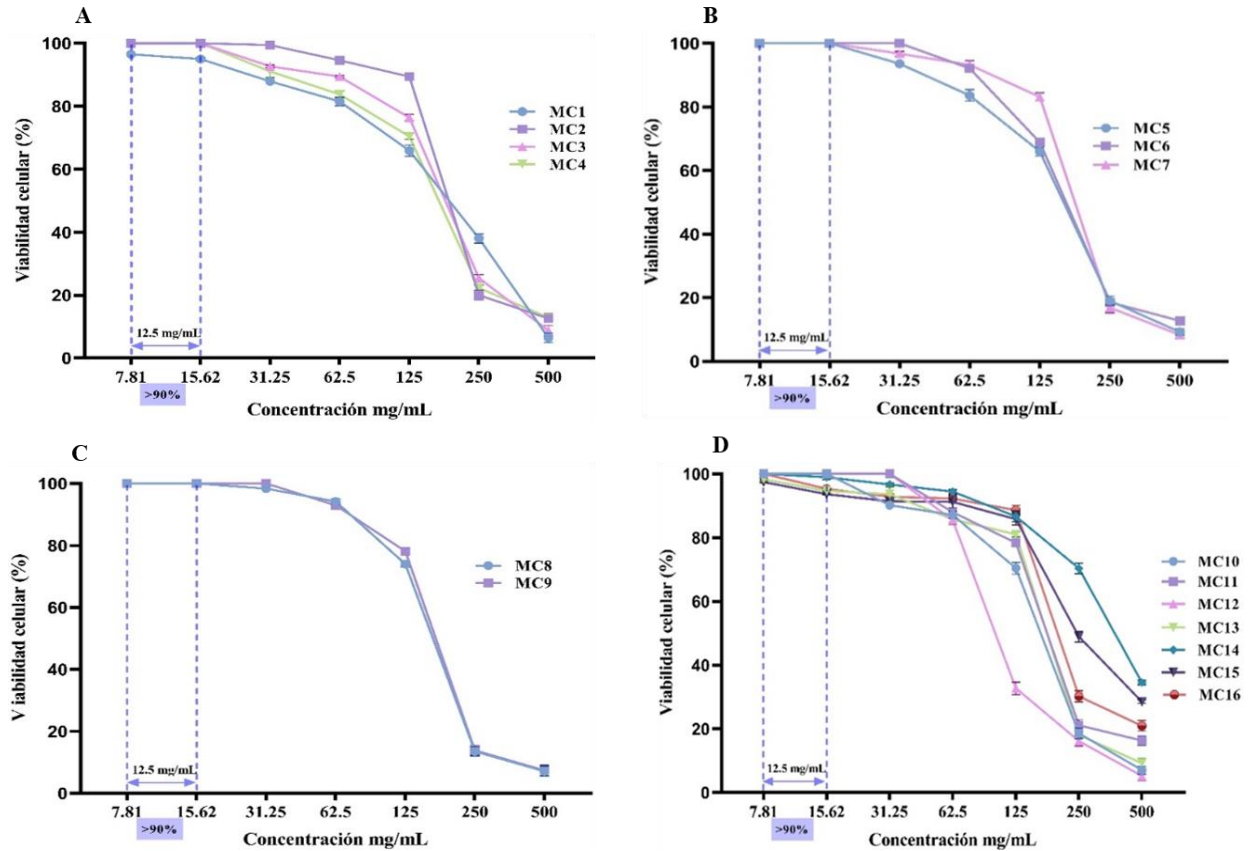


Figura 9. Efecto de la miel de *M. beecheii* colectada en diferentes regiones del estado de Campeche en la viabilidad celular. A) Sureste; B) noreste; C) oeste y D) norte. Las células Vero fueron tratadas con concentraciones crecientes de cada una de las muestras de miel de *M. beecheii* (M1-M16) e incubadas por 48 h, seguidamente se determinó el porcentaje de viabilidad (ensayo SRB) y la concentración citotóxica cincuenta (CC₅₀) usando el programa GraphPad Prism 9.0.2. Los resultados son expresados como la media \pm la desviación estándar (n=3).

Los valores de concentración citotóxica cincuenta (CC₅₀) estuvieron entre un rango de 105.6 a 369.1 mg mL⁻¹, la concentración más alta se encontró en la muestra MC14 de origen monofloral y la más baja en la muestra MC12 de origen multifloral, ambas corresponden a la región norte del estado de Campeche (**Cuadro12**). De la zona sureste, las muestras MC4 (162.5) y MC2 (190.2), tuvieron el valor más bajo y alto respectivamente. De la región noreste, las muestras MC5 (150.8) y MC7 (177.0), fueron las muestras con los valores más bajo y alto, respectivamente. Por último, los valores de las muestras MC8 y MC9 fueron 161 y 166.5. Con la información obtenida en este ensayo y en los márgenes de seguridad, se seleccionaron dos concentraciones (25 y 12.5 mg mL⁻¹) para continuar con los ensayos de citoprotección.

Cuadro 12.- Concentración citotóxica cincuenta en la línea celular Vero de las muestras de miel de *M. beecheii*, colectada en diferentes regiones de estado de Campeche, México

Región	Localidad	Muestra	CC ₅₀ mg mL ⁻¹ , Vero
Sureste			
	20 de Noviembre, Calakmul	MC1 ^{Mu}	169.20 ± 0.03
	20 de Noviembre, Calakmul	MC2 ^{Mu}	190.20 ± 0.02
	20 de Noviembre, Calakmul	MC3 ^{Mo}	178.40 ± 0.02
Sureste	La Lucha I, Calakmul	MC4 ^{Mo}	162.50 ± 0.03
Noreste			
	Xcalot Akal, Hopelchén	MC5 ^{Mu}	150.80 ± 0.02
	Ich ek, Hopelchén	MC6 ^{Mu}	161.00 ± 0.02
	San Antonio, Hopelchén	MC7 ^{Mo}	177.00 ± 0.02
Oeste			
	Sihochac, Champotón	MC8 ^{Mu}	161.00 ± 0.01
	Sihochac, Champotón	MC9 ^{Mu}	166.50 ± 0.01
Norte			
	Pucnachen, Calkiní	MC10 ^{Mo}	158.70 ± 0.02
	Tankunché, Calkiní	MC11 ^{Mo}	177.80 ± 0.01
	Santa María, Calkiní	MC12 ^{Mu}	105.60 ± 0.02
	Sahcabchén, Calkiní	MC13 ^{Mo}	174.60 ± 0.03
	Tankunché, Calkiní	MC14 ^{Mo}	369.10 ± 0.01
	Pucknachén, Calkiní	MC15 ^{Mu}	274.10 ± 0.03
	Santa María, Calkiní	MC16 ^{Mu}	212.20 ± 0.03

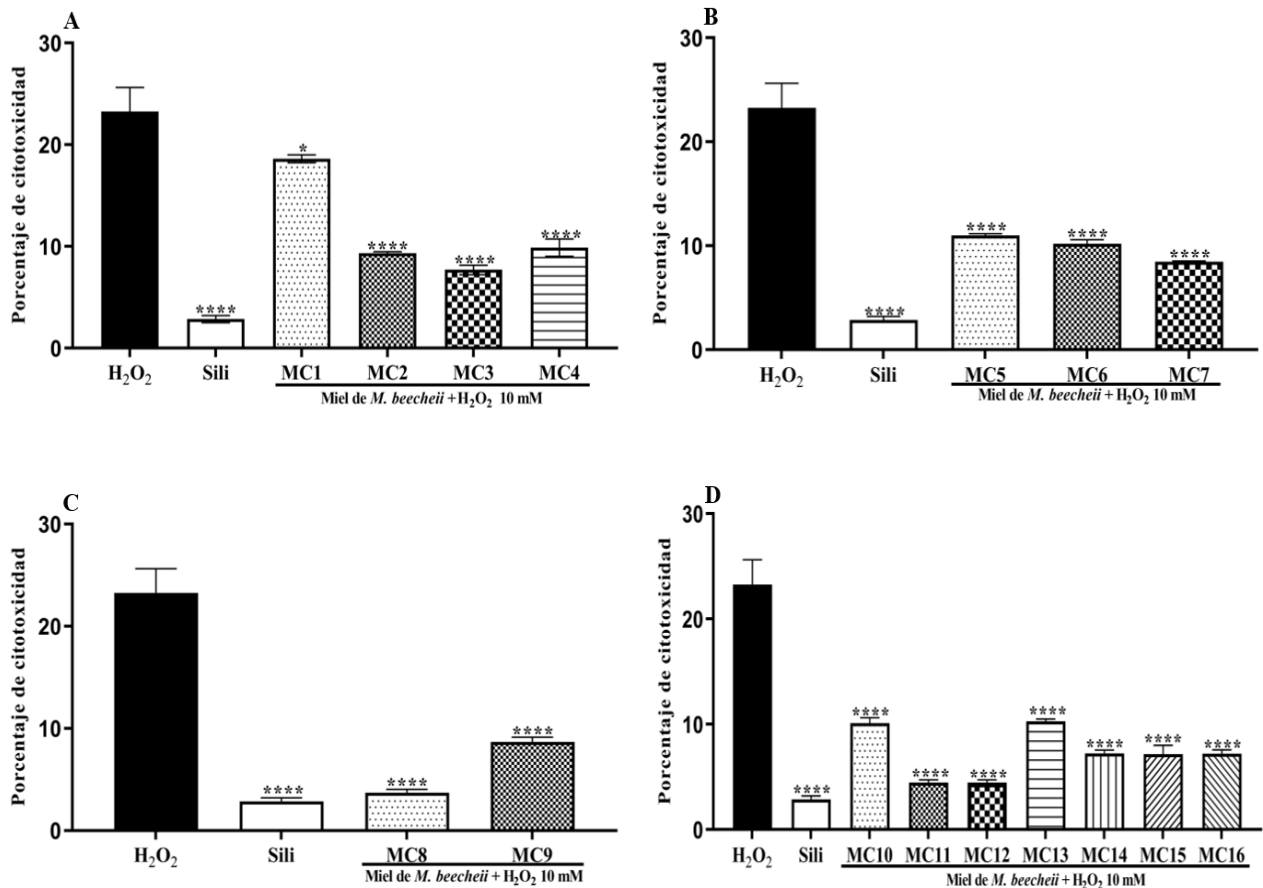
Mo: monofloral; Mu: multifloral; CC₅₀: concentración citotóxica cincuenta

2.5.3.2 Determinación del efecto citoprotector

En cuanto a los resultados del efecto citoprotector (CP), por cada muestra de miel de *M. beecheii* se evaluaron dos concentraciones: 25 y 12.5 mg mL⁻¹. A la concentración de 25 mg mL⁻¹ no se observó efecto citoprotector, en tanto que, a la concentración de 12.5 mg mL⁻¹ se observó un efecto contrario, por esta razón, en este trabajo únicamente se presentan los resultados a la concentración de 12.5 mg mL⁻¹.

Como se puede observar en la **Figura 10 A-D**, el tratamiento con H₂O₂ 10 mM indujo un incremento en el porcentaje de citotoxicidad 23% (considerado como el 100% de daño), en tanto que, el tratamiento con silimarina a 15.62 µg/ mL⁻¹ (control de protección) redujo significativamente (7 veces) el daño inducido por el H₂O₂. Entre las muestras de la región sureste: MC1, MC2, MC3 y MC4 se observó una reducción significativa de la citotoxicidad

inducida por el H₂O₂, hasta 0.2, 1.5, 2.0 y 1.3 veces, respectivamente, la muestra MC3



de origen monofloral fue la que presentó el mayor efecto citoprotector (**Figura 10 A**).

Figura 10. Efecto citoprotector de la miel de *M. beecheii* colectada en diferentes regiones del estado de Campeche, en un modelo de daño oxidativo en líneas celulares inducido con H₂O₂. A) Sureste, B) noreste, C) oeste, D) norte. Las células Vero fueron tratadas con 12.5 mg mL⁻¹ de cada una de las muestras de miel de *M. beecheii* (M1-M16), seguidamente se indujo daño con H₂O₂ 10 mM por 3 h. Finalmente se determinó el porcentaje de citotoxicidad mediante el ensayo de SRB. Los resultados son expresados como la media ± la desviación estándar (n=3), normalizados con el control negativo. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) con prueba a posteriori de *Tukey* ***P<0.0001 vs H₂O₂. Células tratadas solo con H₂O₂ o con 15.62 µg/ mL⁻¹ de silimarina + 10 mM de H₂O₂ fueron empleadas como control de daño y de protección respectivamente.

Por otro lado, las muestras de la región noreste: MC5, MC6 y MC7 redujeron significativamente el daño inducido por el peróxido de hidrógeno hasta 1.1, 1.3 y 1.7 veces respectivamente, destacando entre ellas la muestra MC7 de origen monofloral (**Figura 10 B**). Las muestras de la región oeste MC8 y MC9, redujeron el daño oxidativo ocasionado por el peróxido de hidrógeno hasta 5.2 y 1.6 veces, respectivamente, la

muestra MC8 de origen multifloral resultó ser la más efectiva con valores cercano al control de protección (**Figura 10 C**).

Finalmente, las muestras de la región norte MC10, MC11, MC12, MC13, MC14, MC15 y MC16, también mostraron reducción significativa del daño asociado a peróxido de hidrógeno 10 mM hasta 1.2, 4.2, 4.5, 1.2, 2.2, 2.2 y 2.2 veces respectivamente, la muestra MC12 de origen multifloral, fue la que presentó el mayor CP alcanzando valores similares al control de protección (**Figura 10 D**).

Por otra parte, se realizó un análisis de comparación de medias, entre las 16 muestras de *M. beecheii*, con la finalidad de determinar diferencias significativas entre las muestras en la actividad citoprotectora. El análisis indica que las muestras MC8, MC11 y MC12 presentaron el mayor efecto citoprotector, siendo significativamente iguales entre ellas, pero diferente a las 13 muestras restantes ($P > 0.05$). Asimismo, se observó que las muestras MC8 y MC12, mostraron ser significativamente iguales al control de protección silimarina ($P < 0.05$) (**Figura 11**).

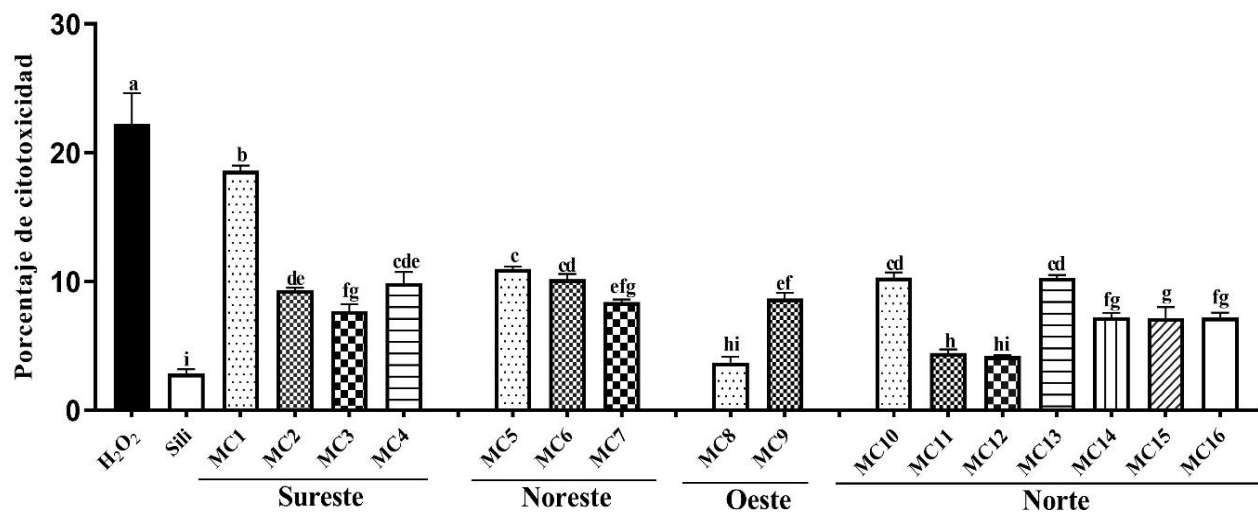


Figura 11. Análisis comparativo del efecto citoprotector de las muestras de miel de *M. beecheii* en función de la región de colecta. Los resultados son expresados como la media \pm la desviación estándar ($n=3$). Análisis de varianza de una vía (ANOVA) con prueba a posteriori de Tukey $P < 0.05$. Barras con letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) entre las muestras.

Por otra parte, la muestra MC1 presentó el menor efecto CP, se observaron diferencias significativas con respecto a las otras 15 muestras ($P > 0.05$). El efecto citoprotector se correlacionó con el color ($r=0.636$, $P < 0.01$), CTF ($r=0.725$, $P < 0.001$), CFTv ($r=0.544$

$P < 0.05$), CRL ($r = 0.684$ $P < 0.01$) y CAEA ($r = 0.709$ $P < 0.01$), y se estableció una correlación más fuerte con el CTF y el CAEA.

2.5.3.3 Análisis de componentes principales

Con la intención de poder clasificar las 16 muestras de miel de *M. beecheii* colectadas en diferentes regiones del estado de Campeche, se realizó un análisis de componentes principales (PCA), tomando en cuenta las nueve variables evaluadas: propiedades fisicoquímicas y actividades antioxidantes en sistema libre y con células (**Figura 12**). El componente principal uno (PC1) explicó el 64.04% de la variabilidad, mientras que el componente principal dos (PC2) explicó el 21.68% de la variabilidad (vectores propios anexo III); en conjunto ambos componentes explicaron el 85.07% de la variación total. El PC1 se correlacionó fuertemente con las variables: color, CTF CTFv CAEA, CRL y CP y ligeramente con la variable pH. Mientras que el PC2, se asoció principalmente con las variables humedad (H) y sólidos solubles totales (SST). Con base en lo anterior, podemos distinguir que las muestras ubicadas en la región positiva del CP1: MC3 (sureste), MC7 (noreste), MC8 y MC9 (oeste), MC11, MC12 y MC15 (norte), se caracterizaron por presentar mayor contenido de antioxidantes y efecto citoprotector asociado al contenido de fenoles y flavonoides, destacando entre ellas las muestra MC12. De igual manera, fueron las muestras con el valor más alto de pH (menos ácidas), contenido medio de SST (azúcares) y contenido medio de humedad (H); a excepción la muestra MC8 que presentó bajo contenido de humedad y alto contenido de azúcares.

Por otra parte, las muestras MC6 (noreste), MC13 (norte), MC14 (norte) y MC16 (norte), se ubicaron en la región negativa de PC1 y positiva de PC2, este grupo se distinguió por presentar un contenido medio de antioxidantes, efecto citoprotector, pH, humedad y sólido solubles, a excepción de la muestra MC14 que presentó el valor más bajo de pH, la más alta humedad y el menor contenido de sólidos solubles. Las muestras, MC1 (sureste), MC2 (sureste), MC4 (sureste), MC5 (noreste) y MC10 (norte), quedaron agrupadas en la región negativa del PC1 y PC2.

Con la información anterior (efecto antioxidante, composición química y citoprotección), se seleccionó la mejor muestra por cada región, con la finalidad de determinar el perfil de flavonoides presentes en cada una de las muestras mediante CLAE.

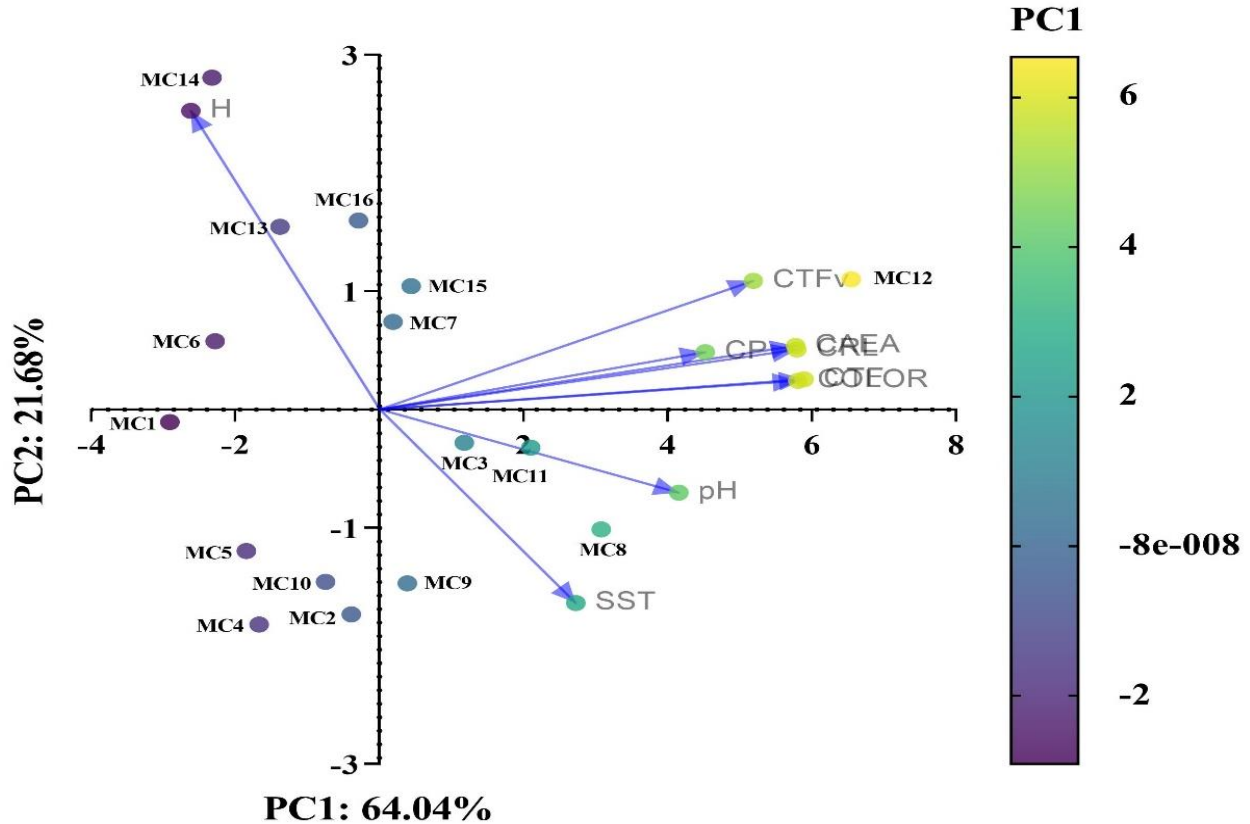


Figura 12. Análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) del potencial de iones hidrógeno (pH), humedad (H), sólidos solubles totales (SST), color, contenido total de fenoles (CTF), contenido total de flavonoides (CTFv), capacidad antioxidante expresada como equivalentes de ácido ascórbico (CAEA), porcentaje de captura de RL (CRL) y citoprotección (CP), de las muestras de miel de *M. beecheii* colectadas en diferentes regiones del estado de Campeche.

2.5.4. Perfil de compuestos flavonoides por CLAE

En este trabajo, se analizó la presencia de nueve flavonoides (**Figura 13 A**) en cuatro muestras de miel (una por cada región). Las cuatro muestras evaluadas presentaron variación en el perfil y contenido de los flavonoides analizados. En la muestra MC3 de la región norte del estado de Campeche se identificó la presencia de los flavonoides: naringenina, miricetina y luteolina, este último fue el de mayor abundancia. (**Figura 13 B**

y **Cuadro13**). En el caso de la muestra MC7 obtenida de la región noreste, se identificó la presencia de: naringenina, miricetina, luteolina y kaempferol, siendo la miricetina la de mayor abundancia (**Figura 13 C** y **Cuadro13**). Para la muestra MC8 de la región oeste, se logró identificar la presencia de: naringenina, miricetina, luteolina, quercetina y apigenina, presentando una mayor abundancia de la miricetina. Finalmente, para la muestra MC12 de la región norte del estado de Campeche, se detectaron los siguientes flavonoides: naringenina, luteolina, quercetina, apigenina y kaempferol, el flavonoide de mayor abundancia fue la luteolina (**Cuadro13**). De manera general, el flavonoide más abundante en las muestras analizadas correspondió a la naringina (167.19 ± 0.32 a 152.39 ± 1.36). Las muestras MC8 (región oeste) y MC12 (región norte) presentaron la mayor cantidad de compuestos flavonoides (5 de 9). Los flavonoides naringenina, hesperetina y la crisina, no fueron identificados en ninguna de las muestras analizadas.

Cuadro 13. Compuesto flavonoides identificados por CLAE-UV en muestras de miel de *M. beecheii*, colectada en diferentes regiones del estado de Campeche, México.

Flavonoide	t_R	Concentración en mg/100 g miel			
		Sureste (MC3 ^{Mo})	Noreste (MC7 ^{Mo})	Oeste (MC8 ^{Mu})	Norte (MC12 ^{Mu})
Naringina	26.07	79.11 ± 0.16	148.46 ± 1.06	119.48 ± 0.58	341.33 ± 7.41
Miricetina	29.35	123.85 ± 2.24	210.57 ± 1.15	161.28 ± 0.51	ND
Luteolina	35.02	169.86 ± 0.74	152.63 ± 0.34	148.16 ± 0.58	405.38 ± 17.96
Quercetina	35.54	ND	ND	99.44 ± 0.02	204.71 ± 2.92
Apigenina	40.14	ND	ND	138.26 ± 1.43	270.91 ± 0.03
Naringenina	40.62	ND	ND	ND	ND
Kaempferol	41.59	ND	168.88 ± 0.35	ND	320.20 ± 0.55
Hesperetina	42.52	ND	ND	ND	ND
Crisina	57.00	ND	ND	ND	ND

ND: no determinado, t_R ; tiempo de retención en minutos; Mo: monofloral; Mu: multifloral.8ñ

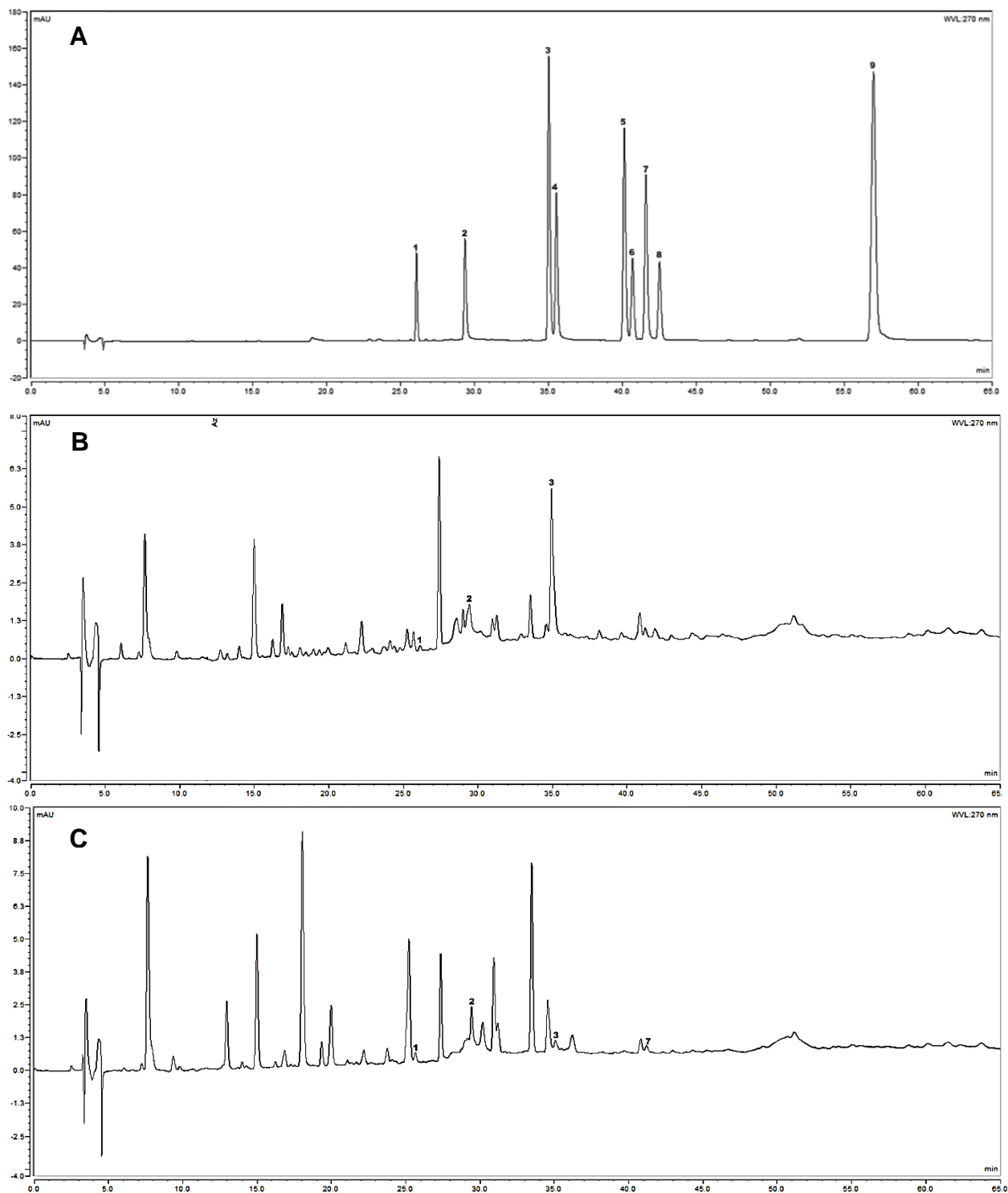


Figura 13. Cromatograma, por cromatografía líquida de alta eficiencia de los estándares de flavonoides a $25 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ (A) y cromatogramas representativos de las muestras de *M. beecheii*: MC3 (B) y MC7 (C). 1. Naringina, 2. Miricetina, 3. Luteolina, 4. Quercetina, 5. Apigenina 6. Naringenina, 7. Kaempferol, 8. Hesperetina 9. Crisina

2.6 DISCUSIÓN

La miel de ASA se caracteriza por tener un sabor agrdulce, a diferencia de la miel de la abeja europea *A. mellifera*, esto debido su bajo pH. En la actualidad, en nuestro país no existe una normatividad establecida que indique los valores máximos y mínimos de pH para mieles obtenidas de ASA. Sin embargo, en otros países como Malasia la normatividad establece un rango de pH 2.5 a 3.8 (MS 2683:2017). En el presente trabajo, obtuvimos un rango de pH entre 3.01 a 3.87, para las 16 muestra de miel de la ASA *M. beecheii*, lo cual concuerda con lo establecido en los estándares de Malasia. Vit *et al.* (2006) encontraron un valor más alto de pH (4.07) en la miel de *M. beecheii* colectada en Venezuela. Por su parte, Moo-Huchin *et al.* (2015) analizaron 27 muestras de miel de *M. beecheii* colectadas en diferentes regiones de la Península de Yucatán, obtuvieron valores de pH de 2.6 a 3.3, lo cual es similar a los datos obtenidos en nuestro estudio. Álvarez-Suarez *et al.* (2018), encontraron un valor promedio de pH de 3.2 para ocho muestras de miel *M. beecheii* colectada en Cuba. Más recientemente, Espinoza-Toledo *et al.* (2018) observaron valores de pH de 3.27 para una muestra de *M. beecheii* colectada en Tapachula, Chiapas. Estos dos últimos reportes concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo.

Por otra parte, se ha determinado que el pH de la miel, puede ser influenciado por el pH del néctar de las flores que las abejas colectan para la elaboración de la miel (Evangelista-Rodríguez *et al.*, 2005). En este contexto, se ha descrito que mieles con un valor de pH inferior a 4 pueden ser catalogadas como mieles de origen floral, en tanto que mieles con un valor superior a 4.5 son categorizados como mieladas (Ismail *et al.*, 2021). De las 16 muestras analizadas en este trabajo, todos los valores estuvieron por debajo de 4, lo cual es indicativo de la gran variedad de especies vegetales, tal como pudo observarse en el análisis palinológico. Otro de los factores que afectan el pH es el contenido de ácidos orgánicos, los cuales son metabolizados por las enzimas provenientes de las secreciones de las abejas, las cuales son añadidas durante el transporte y maduración del néctar, ejemplo de ello es la acción enzimática de glucosa oxidasa sobre la glucosa, la cual es convertida en ácido glucónico (Dardon *et al.*, 2013). Adicional a ello, se ha descrito que valores elevados de humedad favorecen la

fermentación de la miel (asociado a la presencia de levaduras osmotolerantes) lo que finalmente induce un incremento del pH (Sexena *et al.*, 2010; Silvano *et al.*, 2014). En este sentido, el valor promedio de humedad para las 16 muestras de miel de *M. beecheii* analizadas en este trabajo de investigación fue de 24.51, un valor superior a lo establecido para la abeja *A. mellifera* (<20 mg/100 miel) (Codex Alimentarius, 2003). A pesar de ello, estos valores quedaron dentro de los parámetros propuestos por Vit *et al.* (2004), que indica que la humedad para miel derivada de la especie *Melipona* no debe de ser superior a 30g /100g miel. Estos mismos autores, en el año 2006 mencionan un valor de humedad de 24.5% para la miel de *M. beecheii* colectada en Venezuela (Vit *et al.*, 2006), mientras que Moo-Huchin *et al.* (2015) reporta un valor de 23.2%. Ambos reportes concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo. Por otra parte, Álvares-Suarez *et al.* (2018) encontraron un valor promedio de humedad de 28.62% para ocho muestras de miel de *M. beecheii* colectadas en Cuba. En tanto que, Espinoza-Toledo *et al.* (2018) reportaron un valor de 37.2% para una muestra de miel de *M. beecheii* colectadas en Tapachula, Chiapas. Estos dos últimos trabajos mencionan valores mayores en comparación con los encontrados en esta investigación, quizás atribuido a las condiciones climáticas de cada región geográfica.

La elevada humedad en las muestras de ASA, se ha asociado a diversos factores entre ellos: al alto contenido de humedad del néctar que las ASA utilizan para la elaboración de la miel (origen floral), la región geográfica, la forma del recipiente donde se almacena la miel antes y después de la cosecha (Ghazali *et al.*, 2021) y al tiempo de sellado de las celdas de almacenamiento de la miel. Es decir que, mientras la abeja europea *A. mellifera* sella sus celdas cuando los valores de humedad se encuentran entre un 17 a 18%, las ASA realizan este proceso cuando la miel contiene un 24% de humedad (Evangelista-Rodríguez *et al.*, 2006). A pesar de todo ello, el elevado contenido de humedad de la miel de la ASA *M. beecheii*, favorece la fermentación, y esta a su vez, la producción de alcohol etílico y dióxido de carbono, este último responsable de la presencia de burbujas o espuma en la superficie (Saxena *et al.*, 2010). En tanto que, el etanol puede descomponerse en agua y ácido acético, lo cual, contribuye al sabor agrídulce y a la consistencia líquida, característica de la miel de las ASA (Moo-Huchin *et al.*, 2015). Sin embargo, a diferencia de *A. mellifera*, en la que la fermentación es un proceso indeseable,

en caso se la miel de ASA, la fermentación es un proceso favorable, ya que contribuye en la producción de moléculas químicas que le otorgan sus propiedades medicinales (Vit *et al.*, 2004).

A su vez, se ha establecido una relación entre el contenido de humedad y los grados Brix (°Brix), es decir, a medida que aumenta la humedad, los °Brix disminuyen, y por su parte, los °Brix son directamente proporcionales al contenido de SST (azúcar) (de Souza *et al.*, 2016). En este contexto, dicha relación concuerda con resultados de nuestro trabajo. de Souza *et al.* (2016) analizaron el contenido de SST de 24 muestras de miel colectas en la región noreste de Brasil, la miel de las especies *M. subnitida* Duke (n=12) y *M. scutellaris* Latrelle (n=12), presentaron valores medios de 72.55 y 73.15 °Brix, respectivamente. Por otra parte, Moo-Huchin *et al.* (2015) mostraron un valor medio de 75.1 °Brix para la especie *M. beecheii* (n=27). Estos registros son similares a los encontrados en esta investigación (73.83 °Brix). Mientas que, Lage *et al.* (2012), quienes observaron valores promedios más bajos: 68.23 y 68.09 °Brix en las mieles de las especies *M. capixaba* (n=9) y *M. mondury* (n=11), colectadas en diferentes regiones de Brasil. Sin embargo, la miel de la especie *M. rufiventris* (n=7) presentó valores de 74.12 °Brix, similar a nuestros resultados. Más recientemente, dos Santos *et al.* (2021), cuantificaron un valor medio de 96.18 °Brix, que corresponden a ocho muestras de miel de *M. seminigra amerrillae*, colectada en la región norte de Brasil, un valor superior a lo encontrado en nuestro trabajo de investigación. Es importante mencionar que, la miel producida por las ASA presenta un valor bajo de °Brix en comparación con la producida por *A. mellifera* (>75%). Por otra parte, se ha descrito que niveles bajos de azúcares son indicativos de una miel inmadura, pero en el caso de ASA han sido relacionados con el proceso de fermentación (Alves *et al.*, 2005).

Por otro lado, el color de la miel es el primer parámetro de calidad que el consumidor percibe y es un factor decisivo para su comercialización. Este parámetro se encuentra asociado a su origen floral, sin embargo, también se ha descrito que la presencia de minerales y factores como la luz, almacenamiento prolongado, calentamiento, reacciones enzimáticas y el proceso de cosecha, pueden hacer que cambie a una coloración más oscura (Alves *et al.*, 2005). En este entendido, nuestros resultados indicaron un valor

medio de 132.56 mm Pfund, siendo la muestra MC12 la de mayor intensidad de color, caracterizada por su origen multifloral con predominancia de las especies *Bursera simaruba* y *Lonchocarpus longistylus*, en tanto que, la miel con más baja intensidad de color fue la MC1 de origen multifloral, con predominancia de las especies *Pimenta dioica* y *Piscidia piscipula*. En este contexto, Bertoneclicj *et al.* (2007) indicaron que mieles de origen multifloral son más coloridas y pueden abarcar tonos, desde el amarillo hasta el marrón dependiendo de la especie vegetal presente en la muestra de miel. En tanto que, Alvarez-Suarez *et al.* (2017) describieron que es complicado establecer una relación entre el color y las mieles de origen multifloral, debido a que, no hay predominancia de una especie floral, a pesar de ello, reportan un valor promedio de 41.65 mm Pfund para muestras de miel de *M. beecheii* (n=8) colectadas en Cuba. Este valor fue más bajo de lo encontrado en nuestro trabajo de investigación. Por otra parte, estos mismos autores clasificaron a las muestras de miel con un color ámbar extra claro, en tanto que, nuestros resultados únicamente el 18.75% de las muestras analizadas fueron catalogadas como esta misma coloración. Alves *et al.* (2005) analizaron 20 muestras de *M. mandacata* colectadas en Brasil y encontraron que el 5% de las muestras fueron catalogadas como blanco, 5% como blanco agua, 5% como ámbar extra claro, 35% como extra blanco y 50% como ámbar claro. De la misma manera, Moo-Huchin *et al.* (2015), describieron que el 14.8% de las muestras de miel de *M. beecheii* colectadas en la Península de Yucatán fueron catalogadas como blancas, 26% como ámbar extra claro, 37% como ámbar claro, 18.5% como ámbar y el 3.7% como ámbar oscuro. En el caso de nuestro trabajo, el 37.5% fue catalogado como ámbar oscuro. Más recientemente, dos Santos *et al.* (2021), analizaron 8 muestras de miel de *M. seminigra merrillae*, colectada en la región norte de Brasil, encontraron que el 13% fue catalogada como ámbar, 37% como blanco y 50% como ámbar extra claro. Es importante recalcar que, en el mercado internacional, la miel es valorada por su color, mieles más claras tienen precios más elevados, por lo que el predominio de colores claros en la miel de *M. beecheii* puede resultar en un producto de alta calidad y aceptación (Alves *et al.*, 2015). En el presente trabajo de investigación la mayoría de las muestras fue catalogada como ámbar oscuro, lo cual podría influir en el momento de su comercialización. Sin embargo, muchos autores han reportado que las

mieles con coloración oscura tienen un mayor contenido de fenoles y flavonoides (Gheldof *et al.*, 2002; Beretta *et al.*, 2005).

En este entendido, los fenoles y flavonoides son moléculas químicas caracterizadas por la presencia de un anillo aromático sustituido por uno o más grupos hidroxilo. Estos compuestos son sintetizados como parte del metabolismo secundario de las plantas y son propios de cada especie vegetal y, en muchos casos, sirven para contrarrestar el efecto nocivo de las EROs en las plantas (Robards *et al.*, 1999). Para determinar el contenido total de fenoles y flavonoides en las 16 muestras de miel se realizaron los ensayos de Folin-Ciocalteu y cloruro de aluminio, respectivamente. Los resultados indicaron, que la muestra de mayor color (MC12, multifloral) fue la que presentó el mayor contenido de fenoles (736.67 mgGAE/100 g miel) y flavonoides (3.22 mgQE/100 g miel), en comparación con las 15 muestra restantes, mientras que, la muestra con menor color (M1 multifloral), presentó el menor contenido de fenoles y flavonoides. Estos resultados demuestran que la presencia de estas moléculas químicas influye la coloración de la miel. Oliveira *et al.* (2017), registraron en miel un CTF de 82.91, 161.8, 82.18, 61.72. 192.01, 30.71 y 854.62 mgGAE/100 g miel y un CTFv de: 79.73, 43.09, 75.45, 45.42, 30.24, 44.63 y 279.73 mgQE/100 g miel, para las especies *M. asilvai*, *M. q. anthidiodes*, *M.q. quadrifasciata*, *M. mandacaia*, *M. scutellaris*, *M. compressipes* y *M. subnitida*. En el caso de los valores de CTF los datos son concordantes con nuestros resultados, mientras que en relación al CTFv los valores fueron superiores en comparación con nuestros resultados. Por su parte, Alvarez-Suarez *et al.* (2018), reportaron un valor medio de CTF de 94.39 mgGAE/ 100 g miel y un CTFv de 4.19 mg QE/100 g miel en muestras de miel de *M. beecheii* colectadas en Cuba. Ruiz- Ruiz *et al.* (2017) cuantificaron un CTF de 63.22 mgGAE/ 100 g miel y un CTFv de 3.61 mgQE/100 g miel en muestras de miel de *M. beecheii* colectadas en una región del estado de Yucatán. Mientras que, Sousa *et al.* (2016) encontraron una variación en el CFT y CTFv en función de la especie de abeja y la región de colecta, encontrando un rango de valores de 31.5-126.6 mgGAE/100g miel y 2.4-4.2 mgQE/100g miel para *M. subnitida* Duke y un rango de 61.1-34.2 mgGAE/100g miel y 4.4-1.9 mgQE/100g miel para *M. scutellaris* Latrelle. Estos datos concuerdan con nuestros resultados, ya que, al igual que Sousa, nosotros también observamos variaciones en el CFT y CTFv en función de la región de colecta y la composición floral.

En este contexto, se ha reportado la influencia, del origen floral en CFT y el CTFv en muestras de miel de una misma región geográfica (Silva *et al.*, 2013; Alvarez-Suarez *et al.*, 2018). Diversas investigaciones han descrito que las condiciones ambientales y climáticas del sitio donde crecen las plantas, afecta la producción de metabolitos secundarios, y por consiguiente, la composición del néctar (Perna *et al.*, 2013; Flores *et al.*, 2015). Es así, que la vegetación que se desarrolla en regiones calurosas, húmedas y con alta exposición de luz solar, tienden a sintetizar una mayor cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides, y de esta manera protegerse ante el estrés oxidativo ocasionado por la radiación solar (Spayd *et al.*, 2002).

Con la finalidad de determinar el potencial antioxidante de las mieles asociado a su contenido de fenoles y flavonoides, se realizó el ensayo del 2,2-difeil-1picrilhidrazilo (DPPH), el cual, es un radical estable y ha sido ampliamente utilizado para evaluar la actividad de captura de RL de extractos o moléculas. Los resultados indican que todas las muestras presentaron un efecto en el CAEA y porcentaje de CRL dependiente del origen geográfico y botánico. Sin embargo, como era de esperarse (debido a su mayor contenido de fenoles y flavonoides) la muestra multifloral MC12 presentó el mayor valor de CAEA y el mejor porcentaje de CRL, en tanto que, la muestra con el valor más bajo de CAEA correspondió a la muestra MC5 de origen multifloral y el valor más bajo en porcentaje de CRL correspondió a la muestra MC4 de origen monofloral (*Piscidia piscipula*). Es importante destacar que, las diferencias entre los valores de: CTF, CTFv, CAEA y CRL entre las muestras MC4 y MC5 fueron mínimos, por lo que dicho comportamiento podría estar asociado a la presencia de otro tipo de compuesto como: ácidos orgánicos, péptidos productos de las reacciones de Maillard, enzimas, minerales, vitamina C, entre otros componentes minoritarios (Escudero *et al.*, 2013). En este contexto, Sousa *et al.* (2016) encontraron una variación en el CEAE y el % de CRL en función de la especie de abeja y la región de colecta, se encontró un rango de valores de 10.7-23.6 mgCEAE/100g miel y % CRL de 22.7-46.9 para *M. subnitida* Duke y un rango de 4.3-18.9 mgCEAE/100g miel y % CRL de 11.2-29.5 para *M. scutellaris* latrelle, los cuales son concordantes con lo encontrado en nuestro estudio. Por su parte, Biluca *et al.* (2016), observaron variaciones en el contenido de CEAE, de 10.41 a 18.5 mg CEAE/100g

miel, para la abeja *M. marginata*, atribuyendo esta variación al origen geográfico y botánico.

El ensayo DPPH es de gran utilidad y proporcionan información valiosa para realizar el tamizaje de posibles alimentos con potencial antioxidante. Sin embargo, no reflejan las condiciones fisiológicas celulares y no considera parámetros como la absorción, distribución, metabolismo y biodisponibilidad del agente antioxidante. Por lo tanto, los ensayos en modelos en líneas celulares ofrecen una aproximación más exacta, son de bajo costo y relativamente rápidos de realizar (Liu *et al.*, 2005; Wolfe *et al.*, 2007; López-Alarcón *et al.*, 2013; Amorati *et al.*, 2015).

Por esta razón, adicional al ensayo de DPPH, se decidió evaluar el efecto citoprotector de cada una de las muestras de miel de *M. beecheii* en un modelo en líneas celulares. En la literatura existen diversos reportes que refieren el efecto citotóxico de la miel. Como el reportado por Fauzi *et al.* (2011) quienes evaluaron la miel de Tulang de la especie *Apis dorsata* en las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7) y cáncer cervical (HeLa), reportando variaciones en la CC₅₀ de 2.40 a 2.80% para células MCF-7 y HeLa, respectivamente, dicho efecto fue atribuido a la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides. Por su parte, Badrulhisham *et al.* (2020) evaluaron el efecto citotóxico de la miel de Kelulut producida por la especie *Trigona* sp. sobre la línea celular MCF-7, en la que fue obtenido un valor de CC₅₀ de 3.40%, dicho efecto fue asociado al origen geográfico, botánico y contenido total de compuestos fenólicos (1790.40 ± 228.66 µg GAE/g miel). Más recientemente, Mahmood *et al.* (2020) determinaron el efecto citotóxico la miel de *Trigona itama* en la línea celular de carcinoma oral escamoso (HSC-2), obteniendo un valor de CC₅₀ de 0.84%, atribuido a la presencia de ácido cafeico y quercetina. En este contexto, el efecto citotóxico es adecuado cuando lo que se pretende es la prospección de agentes antitumorales, sin embargo, cuando el objetivo es la búsqueda de agentes citoprotectores, la citotoxicidad no es deseable. Con la finalidad de descartar dicha actividad biológica, las 16 muestras de miel fueron evaluadas en la línea celular Vero. Se puede observar que, todas las muestras presentaron un efecto citotóxico dependiente de la concentración, con base a dichos resultados se pudo realizar el cálculo de la CC₅₀ de cada una de las muestras (**Cuadro12**), los cuales fueron altamente

dependientes de la región de colecta y el origen botánico. Tomando en consideración los valores de CC_{50} y los datos obtenidos en las curvas dosis respuesta, se seleccionó la concentración óptima (12.5 mg mL^{-1}) para realizar los ensayos de citoprotección ante el daño oxidativo en células Vero.

Las EROs son generadas como parte del metabolismo del oxígeno, entre ellas se encuentran: el peróxido de hidrógeno H_2O_2 , el radical hidroxilo $^{\circ}OH$ y el anión superóxido $O_2^{\circ-}$. Las EROs son producidas de manera constante por las células como parte de los procesos fisiológicos y bioquímicos (Haliwell *et al.*, 2015). En condiciones normales, las EROs funcionan como agentes antimicrobianos, participan en la señalización celular y en los procesos de apoptosis. Sin embargo, el incremento de las EROs, puede ocasionar daño en los ácidos nucleicos, modificar la estructura y función de los lípidos y las proteínas de las células, conduciendo a la muerte celular por apoptosis o necrosis (Xie *et al.*, 2016). En este contexto, el estrés oxidativo (EO) es un estado fisiológico en el que la homeostasis oxidoreducción se encuentra alterada (Xie *et al.*, 2016). Diversos autores han indicado que el EO puede conducir al desarrollo de enfermedades como: cáncer, Alzheimer, enfermedad cardiovascular, cirrosis y diabetes (Du *et al.*, 2018). Por otra parte, los antioxidantes, actúan contrarrestando el efecto de las EROs, por lo que son necesarios para prevenir o revertir el daño ocasionado a las células.

En este sentido, se evaluó el efecto CP de la miel de *M. beecheii* en un modelo de estrés oxidativo en líneas celulares inducido con peróxido de hidrógeno. El H_2O_2 , atraviesa la membrana celular y en el interior es convertido en el radical hidroxilo, el cual tiene la capacidad de inducir muerte celular por peroxidación lipídica, mediante la oxidación de grupos tioles en las proteínas, enzimas y daño al ADN, por esta razón, en este trabajo se utilizó H_2O_2 como inductor de estrés oxidativo (Jang *et al.*, 2009). El tratamiento con H_2O_2 , indujo un incremento en la producción de EROs, lo cual se reflejó en un aumento del porcentaje de citotoxicidad, en tanto que, el tratamiento con las muestras de miel de *M. beecheii* significativamente redujeron el daño oxidativo expresado como porcentaje de citotoxicidad (**Figura 10**). El mayor efecto citoprotector fue observado en la muestra MC8 de origen multifloral, seguido de la muestra MC12 y MC11 de origen multifloral y monofloral, respectivamente. La muestra MC8, a pesar de ser multifloral se caracterizó

por tener como especies predominantes a *Mimosa bahamensis* y *Senna racemosa*, mientras que la MC12 tubo predominancia a *Bursera simaruba* y *Lonchocarpus longistylus*, en tanto que la MC11 predominó *Lonchocarpus longistylus*. En este sentido, se ha reportado que la especie vegetal *M. pudica*, es una fuente rica de fenoles y flavonoides y se ha mostrado su elevado potencial antioxidante (Zhang *et al.*, 2011). Por su parte, Alsherri *et al.* (2022), describieron que las plantas del género *Senna*, se caracterizan por producir un alto contenido de fenoles flavonoides y, además, encontraron un elevado potencial antioxidante de extractos orgánicos provenientes sus flores. Sánchez-Monrroy *et al.* (2020), describieron el potencial antioxidante de diversas especies del género *Bursera*, el cual, fue asociado a su contenido de flavonoides. En el caso del género *Lonchocarpus*, se ha descrito que producen flavonoides con características muy particulares como la presencia del grupo prenilo (Cassidey & Setser, 2011). Por otra parte, es importante destacar que, hasta la fecha, únicamente se encontró un trabajo en la literatura que describe el potencial CP de la miel de la ASA *Trigona Itama* (0.8%) en células de linfoblastos (WIL2-NS) ante el daño inducido con H₂O₂ (Oio *et al.*, 2021). Por lo tanto, este estudio contribuye a generar conocimiento sobre el potencial citoprotector de la miel de la ASA *M. beecheii*.

Por otro lado, con la finalidad de integrar los datos obtenidos: color, CTF, CFTV, CAEA, CRL y CP, se realizó un análisis de correlación. Todos los parámetros evaluados mostraron una correlación positiva, con diferentes grados de significancia estadística (**Cuadro11**). La correlación positiva observada, indica que las mieles con coloración oscura tienen un mayor contenido de CTF y el CTFv y alta actividad antioxidante (CAEA, CRL y CP). Estos datos son concordantes con lo reportado por Kek *et al.* (2017), quienes analizaron parámetros como: como color, CTF y CAEA. El análisis de PCA mostró que, la mitad de las muestras analizadas se caracterizaron por su elevado contenido de: color, CTF, CTFv, CAEA, CRL, CP pH, SST, sin embargo, las muestras restantes también presentaron actividad antioxidante y citoprotectora, que no fue asociado directamente a un elevado contenido de CTF y CTFv, pero que podría estar asociado a la presencia de otros componentes en las muestras.

Con la información generada, se decidió seleccionar la mejor muestra por cada región del estado de Campeche para determinar el perfil de flavonoides e inferir sobre la actividad biológica y el origen floral (**Cuadro 8**). En este contexto, diversos autores han relacionado la presencia de flavonoides, potencial antioxidante y especie vegetal (Guevara-Fefer *et al.*, 2017; Sánchez-Monroy *et al.*, 2020; Vidal-Gutiérrez *et al.*, 2020). El análisis por CLAE reveló la presencia de los flavonoides: naringenina, miricetina y luteolina en la muestra MC3, y naringina, luteolina, quercetina, apigenina y kaempferol en MC12. En la literatura existen trabajos como el de Alvarez-Suarez *et al.* (2018) quienes registraron la presencia de los flavonoides como quercetina, luteolina, apigenina, kaempferol a partir de muestras de miel de *M. beecheii* de Cuba. Mientras que, Sierra *et al.* (2020) demostraron la presencia de apigenina, quercetina y miricetina, en muestras de miel de *M. beecheii* colectadas en una región del estado de Yucatán. Estos resultados coinciden con los flavonoides encontrados en este trabajo. El análisis palinológico de las muestras MC3 y MC12 permitió catalogarlas como de origen monofloral y multifloral, respectivamente, en la primera predominó la especie *Bursera simaruba*, en tanto que, en la segunda muestra las especies *Bursera simaruba* y *Lonchocarpus longistylus*. Estos resultados coinciden con la literatura, por ejemplo, en el género *Bursera* se ha registrado la presencia de algunos flavonoides como la apigenina, luteolina, kaempferol, yateína, escopoletina, naringina, quercetina y galanina (Maldini *et al.*, 2009; Moustapha *et al.*, 2014; Guevara-Fefer *et al.*, 2017; Sánchez-Monroy *et al.*, 2020); y en el género *Lonchocarpus* flavonoides como quercetina, kaempferol, galangina, miricetina y apigenina (Oyedeki *et al.*, 2015). Esto sugiere que probablemente ambas especies sean la fuente de origen de los flavonoides identificados y los responsables de la actividad antioxidante en la miel de *M. beecheii* en ambas muestras (Santos *et al.*, 2009; Adotey & Isaiah, 2016; Moriasi *et al.*, 2020). También, el análisis palinológico catalogó a la muestra MC7 como monofloral de la especie *Senna racemosa*, mientras que la muestras MC8 fue categorizada como multifloral y las especies predominantes fueron: *Mimosa bahamensis* y *Senna racemosa*. Los resultados del CLAE, revelaron la presencia de naringina, miricetina, luteolina y kaempferol en MC7, y naringina, miricetina, luteolina, quercetina y apigenina en MC8. Esto coincide con algunos de los flavonoides reportados para el género *Mimosa* por ejemplo, la presencia de quercetina, kaempferol, luteolina, fisetina,

apigenina, naringenina y crisina (Yusof *et al.*, 2016; Ijaz *et al.*, 2019), y en el género *Senna* la presencia de escutellareína, rutina, quercimeritrina y kaempferol (Odeja, 2014).

2.7 CONCLUSIÓN

Las muestras de miel de *M. beecheii* del estado de Campeche, presentaron variación en su composición fisicoquímica, química, actividad antioxidante y efecto citoprotector asociado a la región de colecta y el origen botánico. Las muestras con el mejor efecto antioxidante y citoprotector se ubicaron en las regiones oeste y norte del estado de Campeche, su potente efecto antioxidante y citoprotector fue asociado con su elevado color, contenido total de fenoles y flavonoides. Las especies vegetales, *Bursera simaruba*, *Lonchocarpus longistylus*, *Mimosa bahamensis*, *Senna pallida* y *Senna racemosa* podrían ser la fuente de origen de los flavonoides presentes en las muestras de miel de *M. beecheii*.

CONCLUSIONES GENERALES

Nuestros resultados sugieren que los recursos florales empleados por *M. beecheii* son dependientes de las zonas de colecta, en tanto que los tipos polínicos predominantes en las muestras fueron *B. simaruba*, *L. longistylus*, *P. piscipula*, *S. pallida* y *S. racemosa*. Sin embargo, *M. beecheii* puede expandir o alterar sus nichos de alimentación, según la disponibilidad de recursos, resultando en mieles, con una composición florística y características fisicoquímicas dependientes de la zona de colecta. Resultando en compuestos de tipo flavonoide (naringina, miricetina, luteolina, quercetina apigenina y kaempferol), variable en cuanto a diversidad y contenido. Los cuales podrían tener como fuente de origen las especies vegetales *Bursera simaruba*, *Lonchocarpus longistylus*, *Mimosa bahamensis*, *Senna pallida* y *Senna racemosa*. De igual manera, los análisis estadísticos sugieren que los compuestos bioactivos podrían ser los responsables de las características fisicoquímicas como el color, la capacidad antioxidante y el efecto citoprotector, por lo que posiblemente también sean responsables de las propiedades terapéuticas que se le atribuyen a esta miel.

LITERATURA CITADA

- (AOAC) Association of official analytical chemistry (2012). Official method of análisis, 19th ed.;AOAC: Whashington DC.
- Adotey, A. J. N., & Isaiah, A. (2016). The use of flavonoids as a marker for standardization of *Lonchocarpus sericeus*. *The World Journal of Pharmaceutical Sciences.*, 5(4), 55-74.
- Ahmad, F., Anwar, F., & Hira, S. (2016). Review on medicinal importance of Fabaceae family. *Pharmacologyonline*, 3, 151-157.
- Ahmed, S., Sulaiman, S. A., Baig, A. A., Ibrahim, M., Liaqat, S., Fatima, S., Jabeen, S., Shamim, N., & Othman, N. H. (2018). Honey as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Its Molecular Mechanisms of Action. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2018/8367846>
- Alam, F., Islam, M. A., Gan, S. H., & Khalil, M. I. (2014). Honey: A Potential Therapeutic Agent for Managing Diabetic Wounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2014/169130>
- Albores-Flores, V., Marín-Saenz, I. J., López-García, J. A., Sánchez-Gutiérrez, A., & Grajales-Conesa, J. (2018). Antifungal property of honey on in vitro development of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(3), 423-431.
- Albu, A., Radu-Rusu, C. G., Pop, I. M., Frunza, G., & Nacu, G. (2021). Quality assessment of raw honey issued from eastern Romania. *Agriculture*, 11(3), 247.
- Alfaro-Bates RG, González-Acereto J. A., Ortiz-Díaz J. J., Viera-Castro F. A., Burgos-Pérez A.I., Martínez-Hernández E., Ramírez-Arriaga E. (2010). *Caracterización palinológica de las mieles de la península de Yucatán*.
- Aliev, G., Obrenovich, M. E., Tabrez, S., Jabir, N. R., Reddy, V. P., Li, Y., Burnstock, G., Cacabelos, R., & Kamal, M. A. (2013). Link between Cancer and Alzheimer Disease via Oxidative Stress Induced by Nitric Oxide-Dependent Mitochondrial DNA Overproliferation and Deletion. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2013/962984>
- Alimentarius, C. (2003). Codex alimentarius. Guidelines on Nutrition Labeling (CAC/GL 2-1985 (rev 1-1993). Available at: (http://www.codexalimentarius.net/download/standards/34/cxg_002e.pdf).
- Alshehri, M. M., Quispe, C., Herrera-Bravo, J., Sharifi-Rad, J., Tutuncu, S., Aydar, E. F., Topkaya, C., Mertdinc, Z., Ozcelik, B., Aital, M., Kumar, N. V. A., Lapava, N., Rajkovic, J., Ertani, A., Nicola, S., Semwal, P., Painuli, S., González-Contreras, C., Martorell, M., ... Cho, W. C. (2022). A Review of Recent Studies on the Antioxidant and Anti-Infectious Properties of Senna Plants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2022/6025900>

- Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., Brenciani, A., Mazzoni, L., Gasparri, M., González-Paramás, A. M., Santos-Buelga, C., Morroni, G., Simoni, S., Forbes-Hernández, T. Y., Afrin, S., Giovanetti, E., & Battino, M. (2018). Apis mellifera vs Melipona beecheii Cuban polyfloral honeys: A comparison based on their physicochemical parameters, chemical composition and biological properties. *Food Science and Technology*, 87, 272–279.
- Alves, R. M. D. O., Carvalho, C. A. L. D., Souza, B. D. A., Sodré, G. D. S., & Marchini, L. C. (2005). Características físico-químicas de amostras de mel de Melipona mandacaia Smith (Hymenoptera: Apidae). *Food Science and Technology*, 25(4), 644-650.
- Amorati, R., & Valgimigli, L. (2015). Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radical Research*, 49(5), 633–649.
- Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food chemistry*, 63(4), 549-562.
- Apis mellifera Linnaeus, 1758 in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-14.
- Arnold, N., Zepeda, R., Vásquez, D. M., & Maya, M. A. (2018). Las abejas sin aguijón y su cultivo en Oaxaca, México con catálogo de especies. *San Cristóbal de las Casas: Ecosur-Conabio*.
- Atrouse, O. M., Oran, S. A., & Al-Abbadi, S. Y. (2004). Chemical analysis and identification of pollen grains from different Jordanian honey samples. *International journal of food science & technology*, 39(4), 413-417.
- Atrouse, O. M., Oran, S. A., & Al-Abbadi, S. Y. (2004). Chemical analysis and identification of pollen grains from different Jordanian honey samples. *International journal of food science & technology*, 39(4), 413-417.
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). RL, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, (494), 161-172.
- Avila, S., Beux, M. R., Ribani, R. H., & Zambiasi, 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.
- Ávila, S., Hornung, P. S., Teixeira, G. L., Malunga, L. N., Apea-Bah, F. B., Beux, M. R., ... & Ribani, R. H. (2019). Bioactive compounds and biological properties of Brazilian stingless bee honey have a strong relationship with the pollen floral origin. *Food Research International*, 123, 1-10.
- Ayala, A. (1999). Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Folia Entomológica Mexicana*, 106, 1-123.

- Ayala, R., Gonzalez, V. H., & Engel, M. S. (2013). Mexican Stingless Bees (Hymenoptera: Apidae): Diversity, Distribution, and Indigenous Knowledge BT - *Pot-Honey: A legacy of stingless bees* (P. Vit, S. R. M. Pedro, & D. Roubik (eds.); Springer New York, 135–152.
- Badrulhisham, N. S. R., Ab Hamid, S. N. P., Ismail, M. A. H., Yong, Y. K., Zakuan, N. M., Harith, H. H., ... & Nurdin, A. (2020). Harvested locations influence the total phenolic content, antioxidant levels, cytotoxic, and anti-inflammatory activities of stingless bee honey. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23(4), 950-956.
- Báez, C. G., Zamora-Crescencio, P., & Hernández-Mundo, S. C. (2012). Estructura y composición florística de la selva mediana subcaducifolia de Mucuychacán, Campeche, México. *Foresta Veracruzana*, 14(1), 9-16.
- Ball, D. W. (2007). The chemical composition of honey. *Journal of chemical education*, 84(10), 1643.
- Baltrušaitytė, V., Venskutonis, P. R., & Čeksterytė, V. (2007). Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food chemistry*, 101(2), 502-514.
- Barth, O. M. (1989). O pólen no mel brasileiro (pp. 50-65). Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz.
- Battino, M., Giampieri, F., Cianciosi, D., Ansary, J., Chen, X., Zhang, D., Gil, E., & Forbes-Hernández, T. (2021). The roles of strawberry and honey phytochemicals on human health: A possible clue on the molecular mechanisms involved in the prevention of oxidative stress and inflammation. *Phytomedicine*, 86, 153170.
- Belaya, N. I., Belyi, A. V., Zarechnaya, O. M., Shcherbakov, I. N., Pomeshchenko, A. I., & Gorban, O. A. (2019). Spectrokinetic studies of the products of conversion of natural phenols in radical reactions. *Kinetics and Catalysis*, 60(1), 28-36.
- Bennett (1831), *Melipona beecheii*, in GBIF Secretariat 2021. GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset accessed via GBIF.org on 2022-03-17.
- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., & Facino, R. M. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533(2), 185-191.
- 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.
- Beyer, R. E. (1994). The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 26(4), 349-358.

- Bidens pilosa L. in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-18.
- Biluca, F. C., de Gois, J. S., Schulz, M., Braghini, F., Gonzaga, L. V., Maltez, H. F., ... & Costa, A. C. O. (2017). Phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (Meliponinae). *Journal of Food Composition and Analysis*, 63, 89-97.
- 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.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World allergy organization journal*, 5(1), 9-19.
- Bohn, J. L., Diemont, S. A., Gibbs, J. P., Stehman, S. V., & Vega, J. M. (2014). Implications of Mayan agroforestry for biodiversity conservation in the Calakmul Biosphere Reserve, Mexico. *Agroforestry systems*, 88(2), 269-285.
- Bursera simaruba (L.) Sarg. in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-18.
- Cab-Baqueiro, S., Ferrera-Cerrato, R., Quezada-Euán, J. J., Moo-Valle, H., & Vargas-Díaz, A. A. (2021). Sustratos de nidificación y densidad de nidos de abejas sin aguijón en la Reserva de la Biósfera de los Petenes, México. *Acta Biológica Colombiana*, 27(1), 61–69.
- Cabrera, A., & Mach, N. (2012). Flavonoides como agentes quimiopreventivos y terapéuticos contra el cáncer de pulmón. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 16(4), 143-153..
- Camargo, J. M. F., & Pedro, S. R. M. (2003). Meliponini Lepeletier. *Moure JS, Urban D, Melo GAR, Orgs. Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region*.
- Cao, C., Leng, Y., & Kufe, D. (2003). Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response. *Journal of Biological Chemistry*, 278(32), 29667-29675.
- Cao, W., Zhang, J. J., Liu, C. Y., Bai, W. S., & Cheng, N. (2020). A modified Folin-Ciocalteu method for the microdetermination of total phenolic content in honey. *International Food Research Journal*, 27(3), 576-584.
- Carreón-Santos, R. J., & Valdez-Hernández, J. I. (2014). Estructura y diversidad arbórea de vegetación secundaria derivada de una selva mediana subperennifolia en Quintana Roo. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 20(1), 119-130.

- Carvalho CAL, Moreti ACCC, Marchini LC, Alves RMO, Oliveira PCF. 2001. Pollen spectrum of honey of "uruçu" bee (*Melipona scutellaris* Latreille, 1811). *Revista Brasileira De Biologia* 61(1): 63–67.
- Carvalho, C. A., Sodr e, G. S., Fonseca, A. A., Alves, R. M., Souza, B. A., & Clarton, L. (2009). Physicochemical characteristics and sensory profile of honey samples from stingless bees (Apidae: Meliponinae) submitted to a dehumidification process. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 81, 143-149.
- Cassidy, C. E., & N Setzer, W. (2011). Lonchocarpus polyphenolics and their biological activities. *The Natural Products Journal*, 1(2), 75-104.
- Cauich Kumul, R., Ruiz Ruiz, J. C., Ortíz Vázquez, E., & Segura Campos, M. R. (2015). Potencial antioxidante de la miel de *Melipona beecheii* y su relación con la salud: una revisión. *Nutrición Hospitalaria*, 32(4), 1432-1442.
- Ceccon, E., Huante, P., & Rincón, E. (2006). Abiotic factors influencing tropical dry forests regeneration. *Brazilian archives of Biology and Technology*, 49(2), 305-312.
- Chale-Dzul, J., Freile-Pelegr n, Y., Robledo, D., & Moo-Puc, R. (2017). Protective effect of fucoidans from tropical seaweeds against oxidative stress in HepG2 cells. *Journal of Applied Phycology*, 29(5), 2229-2238.
- Cham, K. O., Nocelli, R. C., Borges, L. O., Viana-Silva, F. E. C., Tonelli, C. A. M., Malaspina, O., ... & Rocha, M. C. L. (2019). Pesticide exposure assessment paradigm for stingless bees. *Environmental entomology*, 48(1), 36-48.
- Cheung, Y., Meenu, M., Yu, X., & Xu, B. (2019). Phenolic acids and flavonoids profiles of commercial honey from different floral sources and geographic sources. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 290-308.
- Cienciosi, D., Forbes-Hern andez, T. Y., Afrin, S., Gasparrini, M., Quiles, J. L., Gil, E., Bompadre, S., Simal-Gandara, J., Battino, M., & Giampieri, F. (2020). The Influence of In Vitro Gastrointestinal Digestion on the Anticancer Activity of Manuka Honey. *Antioxidants*, 9 (1). <https://doi.org/10.3390/antiox9010064>
- Codex alimentarius (2003). Guidelines on Nutrition Labeling (CAC/GL 2-1985 (rev 1-1993). Available at:(http://www.codexalimentarius.net/download/standards/34/cxg_002e.pdf).
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad) (2000). http://www.conabio.gob.mx/tecnologia/regionalizacion/doctos/rhp_095.html. Consultado el 27 de enero de 2022.
- Crescencio, P. Z. (2003). Contribución al estudio florístico y descripción de la vegetación del municipio de Tenabo, Campeche, México. *Polibot nica*, (15), 1-40.
- da Luz, C. F. P., Fidalgo, A. de O., Silva, S. A. Y., Rodrigues, S. dos S., & Nocelli, R. C. F. (2019). Comparative floral preferences in nectar and pollen foraging by

- Scaptotrigona postica (Latreille 1807) in two different biomes in São Paulo (Brazil). *Grana*, 58(3), 200–226. <https://doi.org/10.1080/00173134.2019.1579257>
- 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. (a)
- Dardón, M. J., Maldonado-Aguilera, C., & Enríquez, E. (2013). The Pot-Honey of Guatemalan Bees BT - Pot-Honey: A legacy of stingless bees (P. Vit, S. R. M. Pedro, & D. Roubik (eds.)); *Springer New York*, 395–408.
- de Camargo, J. M. F. (2013). Historical biogeography of the Meliponini (Hymenoptera, Apidae, Apinae) of the Neotropical region. In Pot-Honey.. *Springer, New York*, 19-34.
- de Novais, J. S., & Absy, M. L. (2015). Melissopalynological records of honeys from *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) in the Lower Amazon, Brazil: pollen spectra and concentration. *Journal of Apicultural Research*, 54(1), 11-29.
- de Sousa, J. M. B., de Souza, E. L., Marques, G., de Toledo Benassi, M., Gullón, B., Pintado, M. M., & Magnani, M. (2016). Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 645-651.
- Degáspari, C. H., & Waszczyński, N. (2004). Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão acadêmica*, 5(1), 33-40
- De-Melo, A. A. M., Almeida-Muradian, L. B. D., Sancho, M. T., & Pascual-Maté, A. (2018). Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of apicultural research*, 57(1), 5-37.
- Dianzani, M. U. (1987). The role of free radicals in liver damage. *Proceedings of the Nutrition Society*, 46(1), 43-52.
- dos Santos, F. C. F., Angulo, E. L. H., & dos Santos, M. E. C. (2021). Caracterização físico-química de amostras do mel de abelhas nativas. *Scientia Naturalis*, 3(5), 2366-2382.
- Du, X., Wang, X., & Geng, M. (2018). Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Translational neurodegeneration*, 7(1), 1-7.
- Erdtman G. 1960. The acetolysis method. A revised description. *Svensk Botanisk Tidskrift* 54: 561–564.
- Erdtman, G. (1952). On pollen and spore terminology. *The paleobotanist*, 169-176.
- 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.

- Espinoza-Toledo, C., Vázquez-Ovando, A., Santos, R. T. D. L., López-García, A., Albores-Flores, V., & Grajales-Conesa, J. (2018). Stingless bee honeys from Soconusco, Chiapas: a complementary approach. *Revista de Biología Tropical*, 66(4), 1536-1546.
- Eugenia axillaris* (Sw.) Willd. in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-18.
- Euphorbia heterophylla* L. in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-18.
- Evangelista-Rodrigues, A., Silva, E. M., Beserra, E. M. F., & Rodrigues, M. L. (2005). Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em regiões distintas no Estado da Paraíba. *Ciência Rural*, 35(5), 1166-1171.
- 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.
- Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. A., Soler, C., García-Viguera, C., Ortiz, A., & Tomás-Lorente, F. (1994). A simple extractive technique for honey flavonoid HPLC analysis. *Apidologie*, 25(1), 21-30.
- Flores, M. S. R., Escuredo, O., & Seijo, M. C. (2015). Assessment of physicochemical and antioxidant characteristics of *Quercus pyrenaica* honeydew honeys. *Food Chemistry*, 166, 101-106.
- Galicia-Moreno, M., & Gutiérrez-Reyes, G. (2014). The role of oxidative stress in the development of alcoholic liver disease. *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*, 79(2), 135-144.
- Geniotrigona thoracica* (Smith, 1857) in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-14.
- Ghazali, N. S. M., Yusof, Y. A., Mohd Ghazali, H., Chin, N. L., Othman, S. H., Manaf, Y. N., Chang, L. S., & Mohd Baroyi, S. A. H. (2021). Effect of surface area of clay pots on physicochemical and microbiological properties of stingless bee (*Geniotrigona thoracica*) honey. *Food Bioscience*, 40. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100839>
- Gheldof, N., & Engeseth, N. J. (2002). Antioxidant Capacity of Honeys from Various Floral Sources Based on the Determination of Oxygen Radical Absorbance Capacity and Inhibition of in Vitro Lipoprotein Oxidation in Human Serum Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3050–3055. <https://doi.org/10.1021/jf0114637>

- Gleiciani B., P. R., & Campos, M. J. (2014). Aspects of landscape and pollinators—what is important to bee conservation?. *Diversity*, 6(1), 158-175.
- Gliricidia sepium (Jacq.) Kunth in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-18.
- Griffiths, H. R., Dunston, C. R., Bennett, S. J., Grant, M. M., Phillips, D. C., & Kitas, G. D. (2011). Free radicals and redox signalling in T-cells during chronic inflammation and ageing. Du, X., Wang, Griffiths, H. R., Dunston, C. R., Bennett, S. J., Grant, M. M., Phillips, D. C., & Kitas, G. D. (2011). Free radicals and redox signalling in T-cells during chronic inflammation and ageing. *Biochemical Society Transactions*, 39(5), 1273–1278.
- Guevara-Fefer, P., Muñoz-Ocoter, V., Llanos-Romero, R. E., Zúñiga-Ruiz, B., Cárdenas-Vázquez, R. J., Contreras-Jiménez, J. L., & Ocampo-Bautista, F. (2017). Flavonoides de trece especies del género Bursera con potencial antioxidante. *Polibotánica*, (44), 185-193.
- Guimarães, J. T. F., Costa, L., Zappi, D. C., Junior, W. F. B., da Silva Lopes, K., de Oliveira Alves, R. C., & Barth, O. M. (2019). Melissopalynology reveals the foraging preferences of the stingless bee *Melipona seminigra* pernigra Moure & Kerr 1950 (Apidae: Meliponini) in cangas of Serra dos Carajás, southeastern Amazonia. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2020-1004>.
- Gutiérrez M.G, Enriquez E, Lusco L, Rodríguez-Malaver A, Persano L, Vit P. (2009), Caracterización de mieles de *Melipona beecheii* y *Melipona Solani* de Guatemala. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 50(1): 2-6.
- Halbritter, H., Ulrich, S., Grímsson, F., Weber, M., Zetter, R., Hesse, M., Buchner, R., Svojtka, M., & Frosch-Radivo, A. (2018). *Pollen Morphology and Ultrastructure BT - Illustrated Pollen Terminology* (H. Halbritter, S. Ulrich, F. Grímsson, M. Weber, R. Zetter, M. Hesse, R. Buchner, M. Svojtka, & A. Frosch-Radivo (eds.); *Springer International*, 37–65. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71365-6_3
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (2015). Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press*, (5) 20-22.
- Hanifa, H. S., Sartiami, D., Priawandiputra, W., & Buchori, D. (2021). Characteristics of apiculture and meliponiculture in Banten Province, Indonesia: profile of beekeepers, bee and pollen diversity. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 948(1), 12050. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/948/1/012050>
- Harif Fadzilah, N., Jaapar, M. F., Jajuli, R., & Wan Omar, W. A. (2017). Total phenolic content, total flavonoid and antioxidant activity of ethanolic bee pollen extracts from three species of Malaysian stingless bee. *Journal of Apicultural Research*, 56(2), 130-135.

- Heterotrigona itama in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-14.
- Hrncir, M., Jarau, S., & Barth, F. G. (2016). Stingless bees (Meliponini): senses and behavior.. *Journal of Comparative Physiology*, 202(9), 597-601.
- Huberman, A. (1996). Los RL: beneficios y problemas: II. La importancia médica de los RL de oxígeno. *Gaceta Médica de México*, 132(2), 95-184.
- Ijaz, S., Khan, H. M. S., Anwar, Z., Talbot, B., & Walsh, J. J. (2019). HPLC profiling of Mimosa pudica polyphenols and their non-invasive biophysical investigations for anti-dermatoheliotic and skin reinstating potential. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, (109), 865-875.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) (2018). Aspectos geograficos. https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/areasgeograficas/resumen/resumen_04.pdf. Consulted on November 24, 2021.
- Ismail, N. I., Kadir, M. R. A., Zulkifli, R. M., & Mohamed, M. (2021). Comparison of physicochemical, total protein and antioxidant profiles between Malaysian Apis and Trigona honeys. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 25(2), 243-256.
- Issaro, N., Weerakul, T., Machana, S., Ornnim, P., Phanudulkitti, C., Srijan, T., ... & Pattarapanich, C. (2013). Stingless bee honey II: Qualitative and quantitative studies on honey produced by three stingless bee species collected from a mangosteen garden in Chantaburi province., *Thai Journal of Pharmaceutical SciencesThailand*, (38), 16-18.
- Jacaranda obtusifolia (Humb. & Bonpl. 1808) in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-14.
- Jang, J. S., Piao, S., Cha, Y. N., & Kim, C. (2009). Taurine chloramine activates Nrf2, increases HO-1 expression and protects cells from death caused by hydrogen peroxide. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 45(1), 37-43.
- Jiménez, C. I. E., Martínez, E. Y. C., & Fonseca, J. G. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 52(2), 73-5.
- Jones, G. D., & Bryant, Jr, V. M. (2004). The use of ETOH for the dilution of honey. *Grana*, 43(3), 174-182.
- Karak, P. (2019). Biological activities of flavonoids: an overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(4), 1567-1574.
- 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*. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1359185>

- Khongkwanmueang, A., Nuyy, A., Straub, L., & Maitip, J. (2020). Physicochemical Profiles, Antioxidant and Antibacterial Capacity of Honey from Stingless Bee *Tetragonula laeviceps* Species Complex. *E3S Web Conferences* 141. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014103007>
- Kisser J. 1935. Bemerkungen zum Einschluss in glycerin gelatine. *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik* 51: 372–374.
- Kwapong, P., Aidoo, K., Combey, R., & Karikari, A. (2010). Stingless bees. Importance, management and utilization. *A training manual for stingless beekeeping*, 82p.
- Lage, L. G., Coelho, L. L., Resende, H. C., Tavares, M. G., Campos, L. A., & Fernandes-Salomão, T. M. (2012). Honey physicochemical properties of three species of the Brazilian *Melipona*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84, 605-608.
- Leal-Ramos, D. A., & León-Sánchez, D. L. E. (2013). Antagonismo de *Apis mellifera* y *Melipona beecheii* por las fuentes de alimentación. *Revista Cubana de Ciencias Forestales*, 1(2), 1.
- Librado-Carranza G. Plantas nectaríferas y poliníferas en la Costa Chica de Guerrero y municipios aledaños de Oaxaca (2016). *Tlamati Sabiduría*, 7 (2)
- Limón, D., Díaz, A., Mendieta, L., Luna, F., Zenteno, E., & Guevara, J. (2010). Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. *Mensaje bioquímico*, 34(1), 143-155.
- Liu, R.H., & Finley, J. (2005). Potential cell culture models for antioxidant research. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (10), 4311-4314.
- Liyanage, D., & Mawatha, B. (2017). Health benefits and traditional uses of honey: A review. *Journal of Apitherapy*, <https://doi.org/10.5455/ja.20170208043727>
- Lonchocarpus longistylus* Pittier in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-18.
- López-Alarcón, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>
- López-Roblero, E., Cristina, E.-T., José Alfonso, L.-G., Julieta, G.-C., & David Leonor, Q.-G. (2021). Floral resources collected by four native bees species in southern Mexico. *Grana*, 60(1), 57–68. <https://doi.org/10.1080/00173134.2020.1767195>
- Louveaux, J., Maurizio, A., & Vorwohl, G. (1978). Methods of melissopalynology. *Bee world*, 59(4), 139-157.

- Loza, R. A. C., Peñaloza, R. L. C., Bustamante, P. A. H., & Thielema, L. (2003). La enfermedad de hígado graso no alcohólica y su asociación con obesidad y estrés oxidativo hepático. *MedUNAB*, 6(16), 15-20.
- 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eujim.2020.101162>
- Malaysian standard 2017 Kekulut (stingless bee) honey. specification: MS 2683:2017, departament of standard Malaysia.
- Maldini, M., Montoro, P., Piacente, S., & Pizza, C. (2009). Phenolic compounds from *Bursera simaruba* Sarg. bark: phytochemical investigation and quantitative analysis by tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*, 70(5), 641-649.
- Marchini, L. C., Carvalho, C. D., Alves, R. D. O., TEXEIRA, G., OLIVEIRA, P. D., & Rubia, V. R. (1998). Características físico-químicas de amostras de méis da abelha uruçú (*Melipona scutellaris*). In *XII Congresso Brasileiro de Apicultura* (Vol. 201).
- Margalef, R. 1972. Homage to E. Hutchison, or why is there an upper limit to diversity. *Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences* 44, 21-235.
- Martinello, M., & Mutinelli, F. (2021). Antioxidant Activity in Bee Products: A Review. In *Antioxidants*, 10 (1). <https://doi.org/10.3390/antiox10010071>
- Martínez-Vásquez, E. (2019). Miel y soya transgénica. Análisis socioambiental y de género en dos localidades de Hopelchén, Campeche <http://hdl.handle.net/10521/3484>
- Martins A.C.L, Albuquerque P.M.C., Carreira L.M.M. (2011). Espectro polínico de mel de tiúba (*Melipona fasciculata* Smith, 1854, Hymenoptera, Apidae). *Acta Amazonica*, 41(2), 183–190.
- Mates, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153(1-3), 83-104.
- Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., & De Castro, I. N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*, 32(8), 595-603.
- Matos V.R., Santos F.A.R. 2017. Pollen in honey of *Melipona scutellaris* L. (Hymenoptera: Apidae) in an Atlantic rainforest area in Bahia, Brazil. *Palynology* 41(1): 144–156.
- May, J. M. (1999). Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane?. *The FASEB journal*, 13(9), 995-1006.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological chemistry*, 244(22), 6049-6055.

- Medina-Medina, L. A., Hart, A. G., & Ratnieks, F. L. (2014). Waste management in the stingless bee *Melipona beecheii* Bennett (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 61(4), 435-440.
- Meister, A. (1994). Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *The Journal of biological chemistry*, 269(13), 9397-9400.
- Metopium brownei* (Jacq.) Urb. in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-18.
- Michener, C. D.(1974). The social behavior of the bees: a comparative study. *Harvard University Press* 418.
- Michener, C. D. (1999). The corbiculae of bees. *Apidologie*, 30(1), 67-74.
- Michener, C. D. (2000). *The bees of the world*. JHU press. (Vol. 1). 738p.
- Michener, C. D. (2013). The meliponini. In Pot-honey (pp. 3-17). *Springer, New York, NY*. Michener, C. D. (2013). The Meliponini BT - Pot-Honey: A legacy of stingless bees (P. Vit, S. R. M. Pedro, & D. Roubik (eds.); pp. 3–17). *Springer New York*.
- Mimosa bahamensis* Benth. in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-18.
- Mimosa caesalpinifolia* Benth. in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-12.
- Mimosa pigra* L. in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-18.
- Mimosa pudica* L. in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-18.
- Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. in Roskov, Y., Bisby, F., Zarucchi, J., & Novoselova, M. (2014). World Database of Legumes. In O. Bánki, Y. Roskov, M. Döring, G. Ower, L. Vandepitte, D. Hobern, D. Remsen, P. Schalk, R. E. DeWalt, M. Keping, J. Miller, T. Orrell, R. Aalbu, R. Adlard, E. M. Adriaenssens, C. Aedo, E. Aescht, N. Akkari, P. Alfenas-Zerbini, et al., Catalogue of Life Checklist (12, May 2014). <https://doi.org/10.48580/dfp3-382>
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
- Mohammed, M. E. A. (2020). Factors Affecting the Physicochemical Properties and Chemical Composition of Bee's Honey. *Food Reviews International*, 1–12. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1810701>

- Momose, K., Yumoto, T., Nagamitsu, T., Kato, M., Nagamasu, H., Sakai, S., ... & Inoue, T. (1998). Pollination biology in a lowland dipterocarp forest in Sarawak, Malaysia. I. Characteristics of the plant-pollinator community in a lowland dipterocarp forest. *American journal of botany*, 85(10), 1477-1501.
- Moo-Huchin, V. M., González-Aguilar, G. A., Lira-Maas, J. D., Pérez-Pacheco, E., Estrada-León, R., Moo-Huchin, M. I., & Sauri-Duch, E. (2015). Physicochemical properties of *Melipona beecheii* honey of the Yucatan Peninsula. *Journal of Food Research*, 4(5), 25.
- Moriasi, G., Ileri, A., & Ngugi, M. (2020). Cognitive-Enhancing, *Ex Vivo* Antilipid Peroxidation and Qualitative Phytochemical Evaluation of the Aqueous and Methanolic Stem Bark Extracts of *Lonchocarpus eriocalyx* (Harms.). *Biochemistry Research International*. <https://doi.org/10.1155/2020/8819045>
- Moustapha, B. A. H., Gutiérrez-Avella, D. M., Mendoza, S., Rodríguez-Lopez, V., & Castaneda-Moreno, R. (2014). Chemical constituents and antioxidant activity of extracts obtained from branch bark of *Bursera simaruba*. *Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 13(6), 527-536.
- Nissolia fruticosa* Jacq. in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-18.
- 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.
- 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), 4–9.
- Ocampo Rosales, G. R. (2013). Medicinal uses of *Melipona beecheii* honey, by the ancient Maya. In *Pot-Honey* (pp. 229-240). *Springer, New York, NY*. Rosales, G. R. O. (2013). Medicinal Uses of *Melipona beecheii* Honey, by the Ancient Maya BT - *Pot-Honey: A legacy of stingless bees* (P. Vit, S. R. M. Pedro, & D. Roubik (eds.); *Springer New York*. pp. 229–240.
- Oddo, L. P., Heard, T. A., Rodríguez-Malaver, A., Pérez, R. A., Fernández-Muiño, M., Sancho, M. T., & Vit, P. (2008). Composition and antioxidant activity of *Trigona carbonaria* honey from Australia. *Journal of medicinal food*, 11(4), 789-794. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.0724>
- Odeja, O. O., Obi, G., Ogwuche, C. E., Elemike, E. E., & Oderinlo, O. O. (2014). Phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial activities of *Senna occidentalis* (L.) leaves. *International Journal of Herbal Medicine*, 2(4), 26-30.

- Oliveira, R. G. D., Jain, S., Luna, A. C., Freitas, L. D. S., & Araujo, E. D. D. (2017). Screening for quality indicators and phenolic compounds of biotechnological interest in honey samples from six species of stingless bees (Hymenoptera: Apidae). *Food Science and Technology*, 37, 552-557.
- Ooi, T. C., Yaacob, M., Rajab, N. F., Shahar, S., & Sharif, R. (2021). The stingless bee honey protects against hydrogen peroxide-induced oxidative damage and lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro. *Saudi journal of biological sciences*, 28(5), 2987-2994.
- Ortiz-Vázquez E. de la L., Ruiz Ruiz J. C., Magaña Ortiz D. I. & Ramon Sierra J. M. (2016). Stingless Bee's Honey from Yucatán: Culture, Traditional Uses and Nutraceutical Potential. *Nova Science*. ISBN: 978-1-63484-221-1
- Oyedeggi, O. A., Azeez, L., Adewuyi, S. O., Osinfade, B. G., & Bamimore, M. O. (2015). Flavonoid profile, anthocyanin, carotenoid, sugar and vitamin compositions of *Lonchocarpus sericeus* seeds. *African Journal of Food Science and Technology*, 6(5), 131-135.
- Palacios-Chávez, R., Ludlow-Wiechers, B., & Villanueva G, R. V. G. (1991). Flora palinológica de la reserva de la Biosfera de Sian Ka'an, Quintana Roo, México. Centro de Investigaciones de Quintana Roo.
- Pandey, M., Debnath, M., Gupta, S., & Chikara, S. K. (2011). Phytomedicine: An ancient approach turning into future potential source of therapeutics. *Journal of Pharmacognosy and phytotherapy*, 3(3), 27-37.
- Panzella, L., Moccia, F., Nasti, R., Marzorati, S., Verotta, L., & Napolitano, A. (2020). Bioactive phenolic compounds from agri-food wastes: An update on green and sustainable extraction methodologies. *Frontiers in Nutrition*, 7. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnut.2020.00060>
- 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 biósfera Los Petenes, Campeche, México. *Estudios de cultura maya*, 52, 227-254.
- Pennathur, S., & Heinecke, J. W. (2004). Mechanisms of oxidative stress in diabetes: implications for the pathogenesis of vascular disease and antioxidant therapy. *Front Biosci*, 9(1), 565-574.
- Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2009). Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, 14 (6). <https://doi.org/10.3390/molecules14062202>
- Perna, A., Simonetti, A., Intaglietta, I., & Gambacorta, E. (2013). Antioxidant properties, polyphenol content and colorimetric characteristics of different floral origin honeys from different areas of Southern Italy. *Journal of Life Sciences*, 7(4), 428-436.

- Physalis pubescens L. in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-18.
- Piasecka, A., Jedrzejczak-Rey, N., & Bednarek, P. (2015). Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. *New Phytologist*, 206(3), 948-964.
- Pimenta dioica (L.) Merr. in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-18.
- Piña Garza, E. (1996). Los RL: beneficios y problemas: I. Introducción. *Gaceta Médica de México*, 183 (4).
- Pinto, R. S., Silva, A. G., Rêgo, M. M. C., & Albuquerque, P. M. C. de. (2019). Pollen Analysis of the Post-Emergence Residue of Euglossa Bees (Apidae: Euglossini) Nesting in an Urban Fragment. *Sociobiology*, 66(1), 88–96.
- Piscidia piscipula (L.) Sarg. in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-18.
- Psidium guajava L. in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-18.
- Pyrzynska, K., & Pękal, A. (2013). Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods*, 5(17), 4288-4295.
- Quezada-Euán, J. J. G. (2018). *Taxonomy and Diversity of the Stingless Bees BT - Stingless Bees of Mexico: The Biology, Management and Conservation of an Ancient Heritage* (J. J. G. Quezada-Euán (ed.); pp. 1–40). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77785-6_1
- Quezada-Euán, J. J. G., & Alves, D. A. (2020). *Meliponiculture BT - Encyclopedia of Social Insects* (C. Starr (ed.); pp. 1–6). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-90306-4_77-1
- Quezada-Euán, J. J. G., Nates-Parra, G., Maués, M. M., Roubik, D. W., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2018). The economic and cultural values of stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) among ethnic groups of tropical America. *Sociobiology*, 65(4), 534-557.
- Rahman, K., Hussain, A., Ullah, S., & Zai, I. M. (2013). Phytochemical analysis and chemical composition of different branded and unbranded honey samples. *International journal of microbiological research*, 4(2), 132-137.

- Ramalho M, Kleinert-Giovannini A, Imperatriz-Fonseca VL. 1990. Important bee plants for stingless bees (*Melipona* and Trigonini) and Africanized honeybees (*Apis mellifera*) in neotropical habitats: A review. *Apidologie* 21(5): 469–488.
- Ramalho, M. (2004). Stingless bees and mass flowering trees in the canopy of Atlantic Forest: a tight relationship. *Acta Botanica Brasilica*, 18(1), 37-47.
- Ramalho, M., Imperatriz-Fonseca, V. L., & Giannini, T. C. (1998). Within-colony size variation of foragers and pollen load capacity in the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepelletier (Apidae, Hymenoptera). *Apidologie*, 29(3), 221-228.
- Ramírez-Arriaga, E., Pacheco-Palomo, K. G., Moguel-Ordoñez, Y. B., Zepeda García Moreno, R., & Godínez-García, L. M. (2018). Angiosperm Resources for Stingless Bees (Apidae, Meliponini): A Pot-Pollen Melittopalynological Study in the Gulf of Mexico. In P. Vit, S. R. M. Pedro, & D. W. Roubik (Eds.), *Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology*. *Springer International* 111–130.
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4), 152-159.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry*, 66(4), 401-436.
- Roubik, D. W., & Moreno P, J. E. (1991). Pollen and spores of Barro Colorado Island [Panama]. *Pollen and spores of Barro Colorado Island [Panama]*, 36.
- Roubik, D. W. (1992). Ecology and natural history of tropical bees. *Cambridge University Press*, 9(2).
- Roubik, D. W. (Ed.). (1995). *Pollination of cultivated plants in the tropics* (Vol. 118). *Food and Agriculture Organization*.
- Roubik, D. W. (2006). Stingless bee nesting biology. *Apidologie*, 37(2), 124-143.
- Roubik, D. W., & Villanueva-Gutiérrez, R. (2009). Invasive Africanized honey bee impact on native solitary bees: a pollen resource and trap nest analysis. *Biological journal of the Linnean Society*, 98(1), 152-160.
- 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.
- Ruiz-Ruiz, J.C., Acereto-Escoffié, P., Segura-Campos, M.R. (2018). In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of *Melipona beecheii* honey protein fractions. *Journal of Food Measurement and Characterization*, Vol. 12, No. 4 pp 2636-2642.

- SADER. (2020). Norma Oficial Mexicana NOM-004-SAG/GAN-2018, Producción de miel y especificaciones. DOF - Diario Oficial de La Federación, 8.
- Saenz de Rivas, C. (1978). Polen y esporas: (introducción a la Palinología y Vocabulario palinológico). *H Blume*. <https://books.google.com.co/books?id=SFyIAAAACAAJ>
- Sánchez-Chino, X. M., Jiménez-Martínez, C., Ramírez-Arriaga, E., Martínez-Herrera, J., Corzo-Ríos, L. J., & Godínez García, L. M. (2019). Actividad antioxidante y quelante de metales de las mieles de *Melipona beecheii* y *Frieseomelitta nigra* originarias de Tabasco, México. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 22(1), 1-7.
- Sánchez-Dzib, Y. D. L. A., Sosa-Nájera, S., & Lozano-García, M. D. S. (2009). Morfología polínica de especies de la selva mediana subperennifolia en la cuenca del río Candelaria, Campeche. *Boletín de la sociedad botánica de México*, (84), 83-104.
- Sánchez-Monroy, M., García-Bores, A. M., Contreras-Jiménez, J. L., Torres, D. E., Miguel-Chávez, S., & Guevara-Fefer, P. (2020). Biological activity and flavonoid profile of five species of the *Bursera* genus. *Botanical Sciences*, 98(4), 545-553.
- Sandstrom, P. A., Mannie, M. D., & Buttke, T. M. (1994). Inhibition of activation-induced death in T cell hybridomas by thiol antioxidants: oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 55(2), 221-226.
- Santos-Buelga, C., & González-Paramás, A. M. (2017). *Chemical Composition of Honey BT - Bee Products - Chemical and Biological Properties* (J. M. Alvarez-Suarez (ed.); pp. 43–82). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59689-1_3
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Hernández-Carlos, B., & Villanueva-Cañongo, C. (2019). Shikimic acid pathway in biosynthesis of phenolic compounds. *Plant physiological aspects of phenolic compounds*, 35-48. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83815>
- Savard, J., Tautz, D., Richards, S., Weinstock, G. M., Gibbs, R. A., Werren, J. H., ... & Lercher, M. J. (2006). Phylogenomic analysis reveals bees and wasps (Hymenoptera) at the base of the radiation of Holometabolous insects. *Genome research*, 16(11), 1334-1338.
- Saxena, S., Gautam, S., & Sharma, A. (2010). Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food chemistry*, 118(2), 391-397.
- Scaptotrigona bipunctata* (Lepelletier, 1836) in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-14.
- Scripca, L., & Amariei, S. (2018). Research on honey crystalization. *Revista de Chimie*, 69, 2953-2957.

- Selvaraju, K., Vikram, P., Soon, J. M., Krishnan, K. T., & Mohammed, A. (2019). Melissopalynological, physicochemical and antioxidant properties of honey from West Coast of Malaysia. *Journal of Food Science and Technology*, 56(5), 2508–2521.
- Senna pallida* (Vahl) H.S.Irwin & Barneby in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-18.
- Senna racemosa* (Mill.) H.S.Irwin & Barneby in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-18.
- Shamsudin, S., Selamat, J., Sanny, M., Shamsul Bahari, A. R., Jambari, N. N., & Khatib, A. (2019). A comparative characterization of physicochemical and antioxidants properties of processed *Heterotrigna itama* honey from different origins and classification by chemometrics analysis. *Molecules*, 24(21), 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules24213898>
- Sierra, R. 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.
- Silva, T. M. S., dos Santos, F. P., Evangelista-Rodrigues, A., da Silva, E. M. S., da Silva, G. S., de Novais, J. S., dos Santos, F. de A. R., & Camara, C. A. (2013). Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29(1), 10–18. (b)
- Silvano, M. F., Varela, M. S., Palacio, M. A., Ruffinengo, S., & Yamul, D. K. (2014). Physicochemical parameters and sensory properties of honeys from Buenos Aires region. *Food chemistry*, 152, 500-507.
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of diversity. *nature*, 163(4148), 688-688.
- Smardon R. y Faust B. (2006). Introduction: International policy in the biosphere reserves of Mexico's Yucatan peninsula. *Landscape and urban planning*. Vol. 74 pp. 160-192.
- Solanum lanceolatum* Cav. in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-18.
- Solanum verbascifolium* Banks in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-18.
- Sousa, J. M., de Souza, E. L., Marques, G., Meireles, B., de Magalhães Cordeiro, Â. T., Gullón, B., Pintado, M. M., & 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/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.012>
- 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.
- Spayd, S. E., Tarara, J. M., Mee, D. L., & Ferguson, J. C. (2002). Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *American journal of enology and viticulture*, 53(3), 171-182.
- Tetragona clavipes* (Fabricius, 1804) in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-12.
- Tivy, J. (1993). Biogeography: A Study of Plants in the Ecosphere (3rd ed.). *Routledge*. <https://doi.org/10.4324/9781315845227>
- Torel, J., Cillard, J., & Cillard, P. (1986). Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*, 25(2), 383-385.
- Traber, M. G., & Packer, L. (1995). Vitamin E: beyond antioxidant function. *The American journal of clinical nutrition*, 62(6), 1501S-1509S.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- Van Der Kooij, C. J., Vallejo-Marín, M., & Leonhardt, S. D. (2021). Mutualisms and (a) symmetry in plant–pollinator interactions. *Current Biology*, 31(2), R91-R99.
- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, RL y antioxidantes. *Revista Cubana de medicina militar*, 31(2), 126-133.
- Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols*, 1(3), 1112-1116.
- Vidal-Gutiérrez, M., Robles-Zepeda, R. E., Vilegas, W., Gonzalez-Aguilar, G. A., Torres-Moreno, H., & López-Romero, J. C. (2020). Phenolic composition and antioxidant activity of *Bursera microphylla* A. Gray. *Industrial Crops and Products*, 152, 112412.
- Viguiera dentata* (Cavanilles) Spreng. in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-18.
- Villanueva-Gutiérrez, R., Roubik, D. W., & Porter-Bolland, L. (2015). Bee–Plant Interactions: Competition and Phenology of Flowers Visited by Bees BT - Biodiversity and Conservation of the Yucatán Peninsula (GA Islebe, S. Calmé, JL

- León-Cortés, & B. Schmook (eds.); pp. 131–152) . *Springer International Publishing*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06529-8_6
- Villanueva-Gutiérrez, R., Moguel-Ordóñez, Y. B., Echazarreta, G. C. M. & Arana, L. G. (2009). Monofloral honeys in the Yucatán Peninsula, Mexico. *Grana*, 48, 214–223.
- Villanueva-Gutiérrez, R., Roubik, D. W., Colli-Ucán, W., & Tuz-Novelo, M. (2018). The Value of Plants for the Mayan Stingless Honey Bee *Melipona beecheii* (Apidae: Meliponini): A Pollen-Based Study in the Yucatán Peninsula, Mexico. In P. Vit, S. R. M. Pedro, & D. W. Roubik (Eds.), *Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology* (pp. 67–76). *Springer International Publishing*.
- Villaseñor J.L. 2003. Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. *Interciencia* 28: 160-167.
- 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.
- Vit, P., Enriquez, E., Barth, O. M., Matsuda, A. H., & Almeida-Muradian, L. B. (2006). Necesidad del control de calidad de la miel de abejas sin aguijón. *MedULA*, 15(2), 36-42.
- Vit, P., Pedro, S. R., & Roubik, D. (Eds.). (2013). Pot-honey: a legacy of stingless bees. *Springer Science & Business Media*, 653p.
- Von Der Ohe, W., Oddo, L. P., Piana, M. L., Morlot, M., & Martin, P. (2004). Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35(Suppl. 1), S18-S25.
- Waltheria communis* A.St.-Hil. in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-04-18.
- Wodehouse, R. P. (1935). *Pollen grains: Their structure, identification and significance in science and medicine*. New York and London: *McGraw-Hill Book Company, Inc.*
- Wolfe, K. L., & Liu, R. H. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, Vol. 55, No. 22, pp 8896-8907.
- Xie, Z.Z., Liu, Y., Bian, J.S. (2016). Hydrogen sulfide and cellular redox homeostasis. *Oxidative medicine and cellular longevity*. <https://doi.org/10.1155/2016/6043038>
- Yao, L., Datta, N., Tomás-Barberán, F. A., Ferreres, F., Martos, I., & Singanusong, R. (2003). Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry*, 81(2), 159-168.
- Yusof, A. M., Abd Ghafar, N., Kamarudin, T. A., Hui, C. K., & Yusof, Y. A. M. (2016). Gelam honey potentiates ex vivo corneal keratocytes proliferation with desirable phenotype expression. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 16(1), 1-9.

- Zamora, G., Beukelman, K., Berg, B., Arias, M., Umaña, E., Aguilar, I., Quarles van Ufford, L., Worm, E., Fallas, N., & Solorzano, A. (2015). The antioxidant capacity and immunomodulatory activity of stingless bee honeys proceeding from Costa Rica. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, 4. <https://doi.org/10.5455/oams.180415.or.084>
- Zamora, L. G., Beukelman, K., van den Berg, B., Arias-Echandi, M. L., Umaña-Rojas, E., Aguilar-Monge, I., & Gross-Martínez, N. (2014). The antimicrobial activity and microbiological safety of stingless bee honeys from Costa Rica. La actividad antimicrobiana y la seguridad microbiológica de las mieles de abejas sin aguijón de Costa Rica. *Journal of Apicultural Research.*, 53(5), 503-513.
- Zamora-Crescencio, P., Domínguez-Carrasco, M. D. R., Villegas, P., Gutiérrez-Báez, C., Manzanero-Acevedo, L. A., Ortega-Haas, J. J., & Puch-Chávez, R. (2011). Composición florística y estructura de la vegetación secundaria en el norte del estado de Campeche, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (89), 27-35.
- Zhang, J., Yuan, K., Zhou, W. L., Zhou, J., & Yang, P. (2011). Studies on the active components and antioxidant activities of the extracts of *Mimosa pudica* Linn. from southern China. *Pharmacognosy magazine*, 7(25), 35.
- Zuiverloon, T. C. M., de Jong, F. C., Costello, J. C., & Theodorescu, D. (2018). Systematic Review: Characteristics and Preclinical Uses of Bladder Cancer Cell Lines. *Bladder Cancer*, 4, 169–183. <https://doi.org/10.3233/BLC-180167>

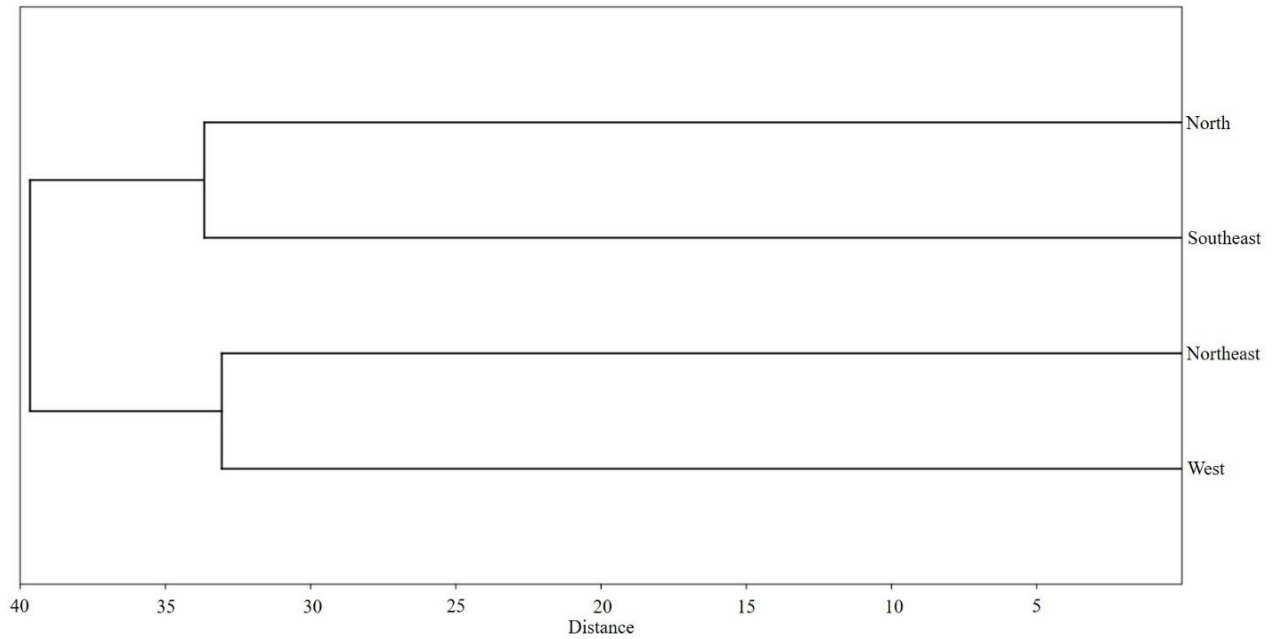
ANEXOS

Anexo I Vector propio de las especies de polen

	PC 1	PC 2
Sureste	0.3677	0.6744
Noreste	0.6566	0.0724
Oeste	0.5803	-0.6704
Norte	0.3110	0.3006

Vector propio de las especies de polen encontradas en las muestras de miel de *Melipona beecheii*

Anexo II Dendrograma de análisis de conglomerados



Dendrograma de análisis de conglomerados utilizando los tipos de polen frecuentes de cada región geográfica, en base a la distancia euclidiana (Grupo pareado UPGMA)

Anexo III Vectores propios de las variables

	PC1	PC2
pH	0.2848	-0.2661
H	-0.1572	0.6416
SST	0.1867	-0.6188
COLOR	0.3982	0.0615
CTF	0.4042	0.0646
CTFv	0.3557	0.2762
CAEA	0.3961	0.1366
CRL	0.3973	0.1287
CP	0.3100	0.1230

Vectores propios de las variables (pH), humedad (H), sólidos solubles totales (SST), color, contenido total de fenoles (CTF), contenido total de flavonoides (CTFv), capacidad antioxidante expresada como equivalentes de ácido ascórbico (CAEA), porcentaje de captura de RL (CRL) y citoprotección (CP), de las muestras de miel de *Melipona beecheii* colectadas en diferentes regiones del estado de Campeche.