

UNIVERSIDAD NACIONAL

Sistema de Estudios de Posgrado (SEPUNA)
Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales (CINAT)
Maestría en apicultura tropical (MAT)

Evaluación de la capacidad antioxidante, actividad antimicrobiana y
parámetros fisicoquímicos en mieles de *Melipona costaricensis*.

Cristina Espinoza Toledo

Heredia, Agosto 2019

Trabajo presentado para optar al grado de Máster en Apicultura
Tropical. Cumple con los requisitos establecidos por el Sistema de
Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional. Heredia. Costa Rica.

Tutor: Luis Gabriel Zamora, PhD.

Asesores:

Eduardo Umaña, M.Sc.

Natalia Fallas, M. Sc.

Eduardo Herrera, M.Sc

Este trabajo se realizó bajo el auspicio del Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales (CINAT), de la Universidad Nacional.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar quiero extender mi agradecimiento al Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales de la Universidad Nacional, y a todo el personal tanto administrativo como académico que colabora en conjunto en este instituto.

De manera particular, agradezco al PhD. Gabriel Zamora por permitirme participar en su equipo de investigación del laboratorio de Microbiología Apícola, a M.Sc. Eduardo Herrera por acompañarme en la colecta de las muestras, así también fue muy grato contar con la colaboración del M.Sc. Eduardo Umaña y la M.Sc Natalia Fallas en el laboratorio de Química Apícola y en el desarrollo e interpretación de dichos resultados de este estudio.

Así mismo, agradezco especialmente a los Meliponicultores que me apoyaron facilitándome las muestras de miel, gracias infinitas, sin ustedes este trabajo no se hubiera llevado a cabo.

Por otro lado, reconozco el apoyo que me brindó el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el Programa de Becas para Estudios de Posgrado en el Extranjero, por lo que me encuentro sumamente agradecida con el gobierno mexicano por proporcionarme la parte financiera y poder culminar mis estudios.

DEDICATORIA

A Dios, principalmente por darme la vida, la salud y la fuerza que necesitaba para seguir adelante y enfrentar todas las adversidades con mucha fe.

A mis padres, de quienes heredé todo lo bueno que hay en mí, por enseñarme a mantener con firmeza cualquier situación que se me presentara, por el apoyo que me brindaron desde el momento que se enteraron de mi venida a Costa Rica y porque a pesar de que estuve lejos de casa, siempre los sentí muy cerca de mí.

A mis hermanas, que siempre están apoyándome en las decisiones que tomo en la vida, y que a pesar de estar una alado de la otra, o a miles de kilómetros de distancia sabemos que siempre estaremos unidas por el corazón.

A mis amigos de México, en especial a la Dra. Julieta Grajales y al Médico José Alfonso López con quienes nunca perdí comunicación, gracias por siempre preocuparse y apoyarme en todo momento.

A mis compañeros de la maestría, que a pesar de todas las situaciones que se presentaron durante este tiempo, pude conocerlos y aprender algo de ellos, en especial a Ana Benítez que para mí fue un gran privilegio tenerte como compañera, amiga y hermana en este maravilloso mundo de las abejas, recuerda que siempre podrás contar conmigo aunque estemos a miles de kms de distancia. "Rohayhu"

RESUMEN

En el presente estudio se realizaron pruebas de actividad antioxidante, antimicrobiana y parámetros fisicoquímicos en mieles de *M. costaricensis*, con el objetivo de proporcionarles un valor agregado a este tipo de mieles poco estudiadas en Costa Rica. Se colectaron 18 muestras de miel de dicha especie en cinco de las siete provincias del país. Posterior a esto, se determinó la densidad y el contenido de agua para calcular la cantidad de disolvente en la preparación de las soluciones de cada una de las mieles. Así mismo, se realizó la prueba de acidez libre y contenido de prolina. Para evaluar la capacidad antioxidante se utilizaron los ensayos de ORAC y TP y por medio del MIC (concentración mínima inhibitoria) se determinó la actividad antimicrobiana. Una vez obtenido los resultados de las pruebas anteriores, se procedió a realizar un análisis de componentes principales (ACP) y una correlación de Pearson. El ACP explica el 63% del total de la variabilidad de los datos obtenidos, teniendo mayor impacto los parámetros que se encontraron en el componente 1 (densidad, contenido de agua y acidez), sin embargo, prolina y MIC presentaron bajo peso en este mismo componente y los parámetros ORAC y TP destacan fuertemente en el componente 2. Todas las muestras están distribuidas entre sí, esto indica que los sitios de colecta no van a determinar el alto o bajo contenido de antioxidantes y actividad antimicrobiana. Por otro lado, ORAC y TP tuvieron una estrecha relación indicando que la capacidad antioxidante de estas mieles está dada por los compuestos fenólicos. No obstante, es importante determinar que estas mieles no tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa*, y sólo el 44% de estas inhibieron a *S. aureus*. En la correlación de Pearson se determinó que densidad y contenido de agua tienen una relación entre sí, lo que nos indica que para el análisis de estas muestras es necesario medir estos parámetros. Con estos resultados es necesaria la selección de las mieles para darles un valor agregado con fines alimenticios o cosméticos ya que algunas presentaron buena actividad antioxidante.

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	JUSTIFICACIÓN.....	2
1.2.	OBJETIVOS.....	2
1.2.1.	OBJETIVO GENERAL.....	2
1.2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
2.	MARCO TEORICO.....	3
2.1.	Meliponicultura en Costa Rica.....	3
2.2.	<i>Melipona costaricensis</i> (Jicote barcino).....	3
2.3.	Capacidad antioxidante.....	3
2.4.	Actividad antimicrobiana.....	5
2.5.	Parámetros fisicoquímicos.....	6
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3.1.	Colecta de muestras.....	8
3.2.	Parámetros Fisicoquímicos.....	9
3.3.	Capacidad Antioxidante.....	9
3.3.1.	ORAC.....	9
3.3.2.	Fenoles totales.....	9
3.4.	Actividad antimicrobiana.....	9
3.4.1.	Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).....	9
4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	10
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
5.1.	Parámetros Fisicoquímicos.....	11
5.2.	Capacidad Antioxidante.....	14
5.3.	Actividad Antimicrobiana.....	16
6.	COMPONENTES PRINCIPALES.....	22
7.	CONCLUSIONES.....	25
8.	RECOMENDACIONES.....	26
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	27
10.	ANEXO.....	34

Lista de cuadros

1. Valores sugeridos para mieles de abejas sin aguijón, comparado con las normas oficiales de la Comisión del Codex Alimentarius para la miel de <i>Apis mellifera</i> (Vit, Medina y Enríquez, 2004).....	7
2. Densidad, contenido de agua y acidez en las muestras de miel de <i>M. costaricensis</i>	11
3. Mediana, media, mínimo y máximo de las variables medidas.....	12
4. Valores de ORAC y TP de las muestras de miel.....	14
5. Mediana, mínimo y máximo de las variables medidas.....	15
6. Correlación de Pearson.....	16
7. Valores de MIC de las muestras de miel contra <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i>	17
8. Mediana, mínimo y máximo del MIC.....	18
9. Porcentaje de las mieles reportadas de <i>T. angustula</i> , <i>Melipona beecheii</i> y <i>M. costaricensis</i> con un MIC \leq de Medihoney.....	20
10. Variables medidas y su coeficiente en el PC1 y PC2.....	23
11. Correlación de Pearson de las variables medidas.....	24

Lista de figuras

1. Sitios de muestreo de la miel de *M. costaricensis* en Costa Rica.....8
2. Porcentaje de muestras activas con *S. aureus* y *P. aeruginosa*.....18
3. Mediana de MDHY, *M. costaricensis* 2014 VS *M. costaricensis* 2019.....19
4. Distribución del MIC de las mieles por zonas de ubicación.....20
5. Análisis de componentes principales de las muestras de miel de *M. costaricensis* por zonas geográficas. ZN=Zona Norte, ZS=Zona Sur, VC= Valle Central y ZA=Zona Atlántica.....22

1. INTRODUCCIÓN

Las abejas nativas o abejas sin aguijón habitan principalmente en el Neotrópico, en donde existen alrededor de 33 géneros y 400 especies, distribuidas desde México hasta Argentina y algunas islas del Caribe, encontrándose en altitudes que van desde cero hasta los 4000 msnm (Camargo y Pedro, 2013).

En Costa Rica existen 20 géneros y 50 especies de abejas nativas, habitando por debajo de los 1500 msnm. *Tetragonisca angustula* y *Melipona beecheii* son las especies que son empleadas en la meliponicultura para la obtención de miel, polen y propóleos (Figuerola et al., 2015).

La miel es la sustancia dulce producida por las abejas a partir del néctar de las flores, se compone principalmente de fructosa y glucosa, así mismo contiene en menor cantidad ciertas componentes como proteínas, ácidos orgánicos, vitaminas, minerales, enzimas, entre otros, los cuales se sabe que presentan propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Molan, 2001; Manzanares et al., 2014).

La miel producida por las abejas sin aguijón es denominada como “miel de pote”, apreciada y utilizada durante años como parte de la medicina tradicional y como edulcorante (Vit et al., 2004, 2013), esta sustancia dulce cuenta con diferentes propiedades biológicas, tales como agente hepatoprotector y cardioprotector (EL-Kholy et al., 2009; El Denshary et al., 2012; Erejuwa et al., 2012a), además de esto, ha sido utilizada para controlar inflamaciones, trastornos visuales, tumores, afecciones gastrointestinales, dermatológicas, respiratorias y diabetes (Vit et al., 2004; El-Arab et al., 2006; Aziz, Guiribabu. Rao y Salieh, 2017).

1.1. JUSTIFICACIÓN

La información relacionada a la capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana de mieles, es escasa en especies de abejas sin aguijón que no son de interés comercial en Costa Rica. Tal es el caso de la especie de *M. costaricensis*, por lo que con dicho estudio se puede generar información útil que pueda brindarle un valor agregado a estas mieles, dejando en claro la necesidad de evaluar el potencial que tienen sobre la actividad biológica y farmacéutica, que en un futuro sean benéficas en el tratamiento de diversas enfermedades y curación de heridas.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad antioxidante, la actividad antimicrobiana y parámetros fisicoquímicos en mieles de *Melipona costaricensis* para darles un valor agregado.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✚ Determinar parámetros fisicoquímicos, capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana en mieles de Jicote barcino y proveerles interés comercial.
- ✚ Determinar parámetros fisicoquímicos y evaluar su relación con la capacidad antioxidante y la actividad antimicrobiana mediante un análisis de correlación y componentes principales.

2. MARCO TEORICO

2.1. Meliponicultura en Costa Rica

La meliponicultura es una actividad conocida desde la época precolombina, desde tiempo atrás, las poblaciones indígenas de México y Centroamérica, criaron y explotaron las abejas sin aguijón para producción de miel y cera (Nates et al., 2009).

Principalmente en Costa Rica las especies más utilizadas en la meliponicultura son *Tetragonisca angustula* y *Melipona beecheii*, las cuales han sido parte fundamental de la cultura prehispánica del país, hoy en día están siendo utilizadas en una gran diversidad de proyectos enfocados en la economía familiar, conservación de los bosques y turismo comunitario, siendo los productos principales la miel, propóleos y polen, los que son consumidos por la población local por sus propiedades curativas (Vaissière, Klein, Cane y Steffan-Dewenter, 2006).

2.2. *Melipona costaricensis* (Jicote barcino)

Las abejas de esta especie son ligeramente más pequeñas, miden de 8-9 mm. En comparación, la abeja *M. beecheii* de unos 10-11 mm. Las abejas *M. costaricensis* presentan bandas amarillentas angostas y cuerpo con poca pubescencia de tonalidad oscura. La entrada del nido tiene forma anillada que sobresale de la superficie, la cual contiene pequeñas perforaciones utilizadas para expulsar el exceso de humedad dentro de la colonia, estas abejas recolectan abundante barro para la construcción de la piquera.

Esta especie presenta un comportamiento tímido, no defiende su nido, salvo raras excepciones, mordiendo levemente la piel. Dentro de la distribución, estas abejas se encuentran principalmente en zonas con altas temperaturas y humedad, desde Limón Puntarenas, Guanacaste, Alajuela y San José (Espinoza et al., 2015).

2.3. Capacidad antioxidante

Los beneficios de la miel de abejas sin aguijón son atribuidas principalmente a sus compuestos antioxidantes como polifenoles, especialmente flavonoides y ácidos fenólicos, estos están fuertemente asociados y varían de acuerdo a la especie de abeja, región geográfica, botánica y condiciones de almacenamiento (Karabagias et al., 2014; Costa, Sousa, Silva, Garruti y Madruga, 2017; Ávila et al., 2018).

Estos compuestos antioxidantes cumplen con la función de bloquear el efecto dañino que causan los radicales libres. Estos son efectivos a bajas concentraciones y se encuentran en alimentos como vegetales y derivados, lo cual explica parte de las acciones saludables de frutas, legumbres, hortalizas, cereales integrales, vino, té y principalmente la miel de abejas (Vit et al., 2008).

Actualmente existen estudios enfocados en evaluar la actividad antioxidante en mieles de abejas sin aguijón. Tal es el caso de las mieles de *T. angustula*, *Plebeia wittmanni* M. y (*Michmelia*) *seminigra merrillae*, estas poseen un alto contenido de flavonoides y compuestos fenólicos (Vattuone et al., 2007; da Silva et al., 2013). Así mismo, Kishore et al., (2011), informaron que la actividad de captación de radicales libres en las mieles de abejas sin aguijón de Tualang es alta, lo cual indica mayor actividad antioxidante.

Así mismo, Álvarez y Suárez (2018), evaluaron la actividad antioxidantes de mieles de *M. beecheii* y de *A. mellifera* encontrando valores más altos de capacidad antioxidante en las mieles del meliponino, así como mayor contenido de compuestos fenólicos como carotenoides, flavonoides, ácido ascórbico, aminoácidos y proteínas en comparación de la abeja de la miel.

Un estudio en la región Noreste de Brasil reveló la actividad antioxidante en mieles de *T. Carbonaria*, *M. fasciculata*, *M. subnitida*, *M fuscopilosa*, siendo la miel de *T. Carbonaria* la que presentó mejor actividad (Silva et al., 2013), lo que indica que la capacidad antioxidante varía en función del tipo de miel (Rao, Krishnan, Salleh y Gen, 2016).

En Costa Rica son pocos los estudios que han documentado los efectos beneficiosos de la miel de abejas sin aguijón, entre estos se ha indicado que la miel de *T. angustula* presenta valores con gran potencial antioxidante frente a Medihoney™ (Zamora et al., 2015), algo similar se demostró en mieles de *S. pectoralis* las cuales poseen altos valores de estos compuestos (Espinoza et al., 2015).

Con esto se ha demostrado que las mieles de las abejas sin aguijón presentan mayor capacidad antioxidante que los reportados para mieles de *Apis mellifera* (Escuredo, Míguez, Fernández, y Carmen, 2013; Khalafi, Goli, Isfahani, 2015; Sancho et al, 2016; Nweze et al., 2017; Giordano *et al.*, 2018; Souza et al., 2018).

2.4. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de las mieles depende de diferentes factores fisicoquímicos, tales como, la concentración de azúcares (eliminando la mayoría de bacterias por ósmosis), la acidez, la presencia de fitoquímicos como compuestos fenólicos y por la acción del peróxido de hidrogeno producido por la enzima glucosa oxidasa secretada por las glándulas hipofaríngeas de las abejas (Pimentel, Alves, Melchionna y Duvoisin, 2013).

Por otro lado, los agentes antimicrobianos son actualmente el único método conocido para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Nweze, Okafor, Nweze y Nweze, 2016), pero el uso inapropiado de antibióticos ha dado lugar a muchas formas de resistencia bacteriana (Osés et al., 2016).

La miel, es una alternativa natural que se emplea en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias y hongos sin causar resistencia alguna (Vit et al., 2004; Guerrini et al., 2009), muestra efectos contra varios microorganismos como *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Helicobacter pylori*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Al Somal et al., 1994; McGovern et al., 1999; DeMera y Angert, 2004; Howell-Jones et al., 2005).

Estudios reportados comprueban que la miel de *T. angustula* presenta actividad antimicrobiana contra la bacteria *S. aureus* (Miorin et al., 2003), así mismo Sgariglia et al., 2010 muestran que la miel de esta misma especie tiene actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (*S. aureus*, *Enterococcus faecali*, *P. aeruginosa* y *E. coli*).

Caso contrario, en México se demostró que sólo a concentraciones altas, las mieles de *S. mexicana* presentan inhibición contra microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecali* y *Pseudomonas aeruginosa*, pero estas no inhibieron el crecimiento de levaduras como *Candida albicans* y *Aspergillus flavus* (Jimenez et al., 2016), así mismo, Marín et al., (2016) reporta la inhibición de *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones de mieles de *M. beecheii*, *M. solani* y *S. mexicana*, pero no inhibieron el crecimiento de *Candida albicans* y *Colletotrichum gloesporioides*.

En contraste, los estudios reportados en Costa Rica son el de Bruijin Sommeijer (1997), De Mera y Angert (2004) y Zamora et al., 2014, quienes analizaron mieles de abejas sin aguijón (*T. angustula*, *M. beecheii*) y *A. mellifera* mostrando inhibición contra *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* y *S. cerevisiae*. Estos últimos autores demostraron que las mieles de *T. angustula* pueden ser utilizadas para tratamientos de heridas y quemaduras, inhibiendo estas bacterias en concentraciones mínimas inhibitorias, e incluso más bajas que Medihoney™.

2.5. Parámetros fisicoquímicos

Las mieles son una mezcla compleja de carbohidratos, principalmente glucosa y fructosa, además de enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, minerales, sustancias aromáticas, vitaminas, pigmentos, cera y polen que contribuyen en el color, olor y sabor. Sin embargo, el sabor tiende a ser desde amargo hasta ligeramente dulce, que varía entre las especies de abejas y las flores que visitan (Souza et al., 2006; Vit, 2013).

Sin embargo, la composición de la miel de abejas sin aguijón es muy distinta a la de *A. mellifera* (Cuadro 1), principalmente en el contenido de agua, ocupando el segundo lugar como mayor componente de estas mieles (20-40%), influenciado por el origen botánico del néctar, condiciones climáticas y la manipulación durante la cosecha de la miel, el contenido de agua es considerado uno de los factores que afectan severamente las características de la miel, tales como la viscosidad, maduración, sabor y cristalización (Silva et al., 2010).

Cuadro 1. Valores sugeridos para mieles de abejas sin aguijón, comparado con las normas oficiales de la Comisión del Codex Alimentarius para la miel de *Apis mellifera* (Vit, Medina y Enríquez, 2004)

Composición de la miel	<i>A. mellifera</i>	Meliponas	Trigonas	Scaptotrigonas
Contenido de agua (g/100g)	Max. 20	Max. 30	Max. 30	Max. 30
Azúcares reductores (g/100g)	Min. 65	Min. 50	Min. 50	Min. 50
Sacarosa (g/100g)	Max. 5	Max. 6	Max. 6	Max. 2
Acidez (meq/100g)	Max. 40	Max. 70	Max. 75	Max. 85
Cenizas (g/100g)	Max. 0.5	Max.0.5	Max.0.5	Max.0.5
HMF (mg/kg)	Max. 40	Max. 40	Max. 40	Max. 40
Actividad de Diastasa (DN)	Min. 8	Min. 3	Min. 7	Min. 3

Los parámetros fisicoquímicos realizados en este estudio son principalmente para comprobar si existe una relación entre estos parámetros, la actividad antioxidante y antimicrobiana en las muestras de mieles, y así mismo, determinar si el néctar es el precursor primordial de dichas propiedades o bien la abeja está aportando estos componentes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los parámetros que se evaluaron en este estudio son humedad por el índice de refracción, densidad por el método de gravedad, acidez por titulación con hidróxido de sodio y prolina por espectrofotometría. Para determinar la capacidad antioxidante de las muestras de miel, se realizaron los ensayos de ORAC y fenólicos totales. Y finalmente por medio de la concentración mínima inhibitoria (MIC) se evaluó la actividad antimicrobiana.

3.1. Colecta de muestras

Se colectaron 18 muestras de miel de *M. costaricensis* de cuatro regiones de Costa Rica (Zona norte, Zona Sur, Valle Central y Zona Atlántica) con ayuda de los dueños de dichas colmenas (Figura 1). Las muestras se tomaron con las medidas higiénicas necesarias en recipientes ámbar con ayuda de jeringas de 20 ml adaptadas con mangueras completamente estériles. Las mieles se colectaron tanto de cajas racionales, rusticas o troncos. La toma de muestra se realizó entre los meses de Febrero y Marzo de 2019. Una vez obtenidas se llevaron al Laboratorio de Química Apícola del CINAT, almacenándose en un lugar fresco, seco a una temperatura de 23 ° C, alejados de la luz.

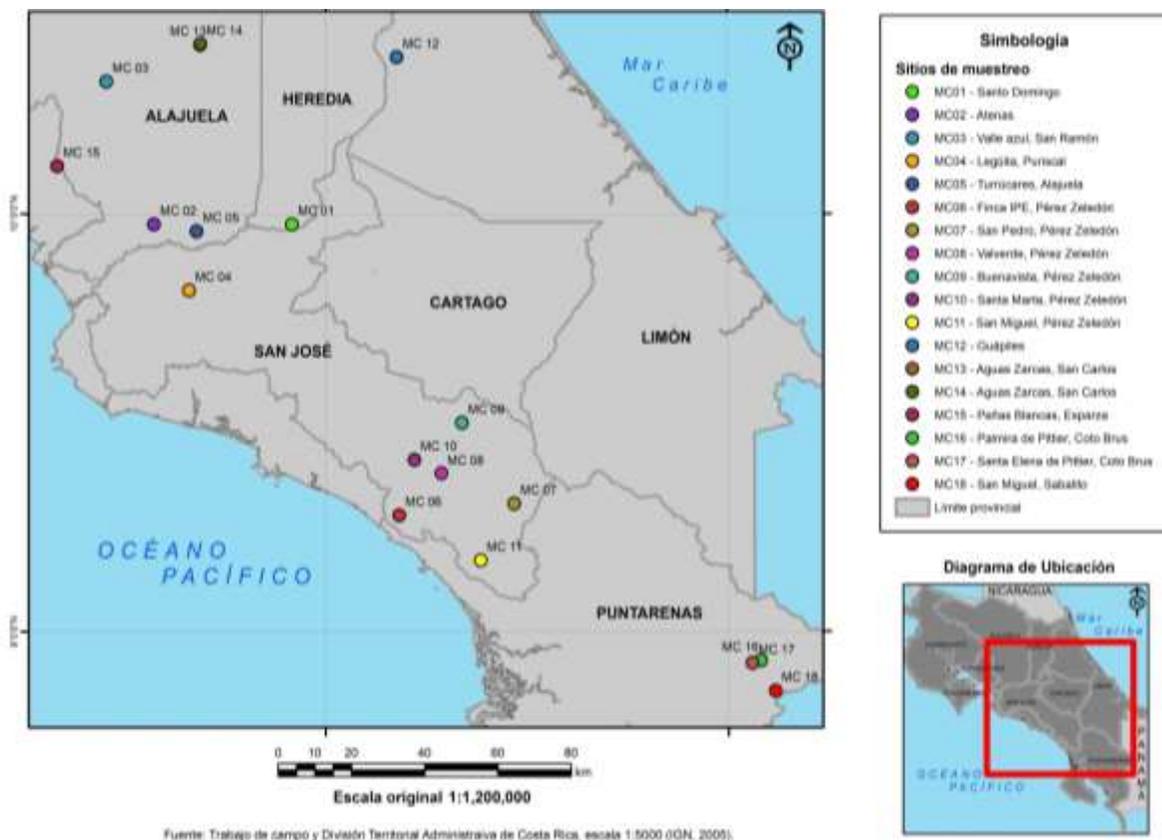


Figura 1. Sitios de muestreo de la miel de *M. costaricensis* en Costa Rica

3.2. Parámetros Fisicoquímicos

Los valores de Densidad, Acidez libre, Contenido de agua y Prolina se realizaron de acuerdo a los métodos estandarizados por la Comisión Europea de la miel y descritos por Bogdanov et al; 2009.

3.3. Capacidad Antioxidante

3.3.1. ORAC

El valor ORAC de cada una de las muestras de miel, se realizó a partir de los procedimientos descritos por Zamora et al; 2015. Este ensayo mide la capacidad de los antioxidantes para reaccionar con un radical libre de origen biológico. Cada muestra se analizó por triplicado.

3.3.2. Fenoles totales

El ensayo sirve para caracterizar una muestra en términos de contenido de antioxidantes, en especial cuando se trata de mieles con una composición mayoritaria de fenoles. Dicho ensayo se realizó empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu según una modificación al método descrito por Zamora et al; 2015. Los valores de contenido de TP se presentan como microgramos de equivalentes de ácido gálico (GAE) por miligramo de miel ($\mu\text{g GAE/mg}$). Cada muestra y la referencia fue objeto de tres análisis separados.

3.4. Actividad antimicrobiana

3.4.1. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Las muestras se desarrollaron en un ensayo de concentración mínima inhibitoria (MIC) realizado en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Dicho ensayo, se realizó de acuerdo al protocolo de Zamora et al; 2015. Las pruebas se realizaron contra cepas de la American Type Culture Collection (ATCC) de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). Se emplearon estas cepas, ya que estos microorganismos regularmente están asociados a infecciones de heridas y quemaduras.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los parámetros fisicoquímicos y capacidad antioxidante se realizó un análisis descriptivo, para comparar las medias, medianas y valor mínimo y máximo de las variables entre las muestras. Además, para la capacidad antioxidante también se determinó el coeficiente de correlación de Pearson para observar la asociación entre el valor ORAC y fenoles totales. Para la actividad antimicrobiana se efectuó un análisis comparativo, para observar la diferencia del valor MIC con datos de mieles de especies ya reportadas. Finalmente, se determinó un análisis multivariado para observar la distribución de los datos obtenido al final de la investigación. Esto con ayuda del programa MiniTab 2018.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Parámetros Físicoquímicos

Los valores de densidad, contenido de agua, acidez y prolina de las mieles analizadas se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Valores de densidad, contenido de agua, acidez y prolina, obtenidos en las muestras de miel de *M. costaricensis*.

MUESTRAS	DENSIDAD (g/ml) ±0.003	CONTENIDO DE AGUA (% DE H ₂ O) ±0.2	ACIDEZ LIBRE (meq/kg)±1	PROLINA (mg/kg)±5
Mc 01	1.3702	24.3	18	194
Mc 02	1.3777	23.1	7	35
Mc 03	1.3665	24.5	11	59
Mc 04	1.3754	22.1	11	30
Mc 05	1.3545	26.2	46	88
Mc 06	1.3685	25.1	21	45
Mc 07	1.3831	23.0	18	50
Mc 08	1.3689	25.1	15	67
Mc 09	1.3663	26.0	45	85
Mc 10	1.3814	23.1	16	32
Mc 11	1.3706	25.0	15	55
Mc 12	1.3567	26.0	24	25
Mc 13	1.3455	28.4	32	32
Mc 14	1.3581	26.1	31	48
Mc 15	1.3732	24.0	21	59
Mc 16	1.1806	39.4	50	21
Mc 17	1.3559	26.3	30	73
Mc 18	1.3742	23.4	14	74

En cuanto a densidad, las muestras de miel analizadas presentaron un ámbito de 1.18–1.38 g/ml (Cuadro 3). La muestra Mc 16 (Palmira de Pittier, CB) presentó el valor relativamente más bajo, esta miel fue la más viscosa, de lo contrario Mc 07 (San Pedro, PZ) y Mc 10 (Santa Marta, PZ) fueron los más altos, es decir las menos densas, Zamora *et al.*, (2015) reportaron un ámbito cercano a lo observado en este estudio (1.352-1.369 g/ml), lo mismo para mieles de *T. angustula* mostrando valores de 1.334-1.397 g/ml, y en mieles de *T. perangulata* y *S. pectoralis* de 1.310 y 1.378 g/ml, de esta última especie también se ha reportado por Espinoza *et al.*, (2015) con valores similares.

Cuadro 3. Mediana, media, mínimo y máximo de las variables medidas.

VARIABLES	MEDIANA	MEDIA	MÍNIMO	MÁXIMO	CV (%)
DENSIDAD (g/ml)±0.003	1.37	1.36	1.18	1.38	3
CONTENIDO DE AGUA (% DE H ₂ O) ±0.2	25.0	25.6	22.1	39.4	15
ACIDEZ LIBRE (meq/kg)±1	20	23	7	50	55
PROLINA (mg/kg)±5	52.5	59.6	21	194	66

Por otro lado, se observó un ámbito de 22.1-39.4 % en contenido de agua (Cuadro 3), la mayoría de las muestras se encuentran dentro de lo propuesto por Vit *et al.*, 2004 quienes mencionan valores >30%, la muestra Mc 16 (Palmira de Pittier, CB) presentó el valor más alto y el más bajo correspondió a la muestra Mc 04 (Legüita, P), además de las mieles Mc 07 y Mc 10 también se encontraron entre los valores bajos. Zamora *et al.*, (2015) reportan valores de 26.7% para mieles de *M. costaricensis*, para mieles de *T. angustula* de 22.1%, y de *T. perangulata* y *S. pectoralis* valores de 31.8 y 25.1% respectivamente. De la misma manera, Espinoza *et al.*, (2015) reporta un ámbito de 21.2-31.5 % para muestras de *S. pectoralis*. En otros países se reportan ámbitos de 22-28.9% para mieles de *Melipona scutellaris*, *Melipona subnitida* y *Melipona beecheii* de Brasil y México (Sarmiento *et al.*, 2013; Moo *et al.*, 2015; Batista *et al.*, 2016). Todos estos cercanos a lo encontrado en este estudio.

Se observó una relación entre los parámetros antes mencionados, los cuales fueron altamente significativos ($p < 0.001$) y una correlación negativa (coeficiente de Pearson = -0.973), es decir mientras una de estas variables aumenta la otra disminuye, esto es similar a lo reportado por Zamora et al., (2015).

La acidez presentó una mediana de 20 con un mínimo de 7 meq/kg para las muestras Mc 02 (Atenas) y un máximo de 50 meq/kg correspondiendo a Mc 16 (Palmira de Pittier, CB), la miel más ácida. Dardón y Enríquez (2008), reportan ámbitos bajos en mieles de Meliponinos de Guatemala desde 4-23 meq/kg, similares a la mayoría de los encontrados en este estudio, por otro lado, se han reportado valores altos en mieles de Meliponas de México con rangos de 24-65 meq/kg (Espinoza et al., 2018), todos estos valores se encuentran dentro de lo reportado por Vit, Medina y Enríquez (2004), como máximo de 70 meq/kg para especies del género Meliponas.

El contenido de Prolina es un indicador de la calidad y adulteración de las mieles, este parámetro presentó una mediana de 52.5 mg/kg, con un mínimo de 21 mg/kg y un máximo de 194 mg/kg. Sin embargo, la Comisión Internacional de la Miel (IHC) propone un valor mínimo de 180 mg/kg para mieles frescas (Bogdanov et al., 1999), comparando con este estudio, todas las muestras presentaron valores muy bajos a excepción de la miel Mc 01 (Santo Domingo, H) con un valor de 194 mg/kg.

Hay estudios que también muestran valores muy bajos de prolina en mieles del mismo género de abejas, siendo valores desde 4.6-20 mg/kg (Batista et al., 2016), de lo contrario, se ha encontrado valores donde el contenido de este aminoácido es alto, que van desde 264-1193 mg/kg en mieles de *M. beecheii* en México (Moo-Huchin et al., 2015). Esta variación depende principalmente del origen botánico y de la especie de abeja respectivamente.

Los parámetros de densidad como el contenido de agua tienen un coeficiente de variación bajo, esto significa que los datos de ambas variables presentaron valores similares entre las muestras. Por otro lado, los parámetros de acidez libre y prolina mostraron un coeficiente de variación muy alto, es decir los datos revelaron mucha variabilidad entre ellos.

Cabe destacar, que todos los valores antes mencionados van a depender de las condiciones ambientales, especie de abeja, área geográfica y la temporada de cosecha, por lo que estos factores pueden variar cada año (Acquarone et al., 2007).

5.2. Capacidad Antioxidante

Todas las muestras de *M. costaricensis* presentaron capacidad antioxidante (Cuadro 4), el valor mínimo de ORAC fue de 106 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ correspondiendo a la muestra Mc 13 (Aguas Zarcas, San Carlos), y el valor máximo fue de 732 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ para la muestra Mc 08 (Valverde, Pérez Zeledón).

Cuadro 4. Valores de ORAC y TP de las muestras de miel de *M. costaricensis* analizadas

MUESTRAS	ORAC ($\mu\text{mol TE}/100\text{g}$)	SD	TP ($\mu\text{g GAE}/\text{mg}$)	SD
Mc 01	215	7	0.29	0.03
Mc 02	199	49	0.15	0.01
Mc 03	527	42	0.25	0.02
Mc 04	325	48	0.20	0.01
Mc 05	157	23	0.15	0.01
Mc 06	324	31	0.32	0.02
Mc 07	205	36	0.21	0.02
Mc 08	732	65	0.51	0.04
Mc 09	230	28	0.26	0.03
Mc 10	389	38	0.28	0.01
Mc 11	291	26	0.31	0.04
Mc 12	204	36	0.24	0.01
Mc 13	106	52	0.22	0.01
Mc 14	157	46	0.25	0.01
Mc 15	232	23	0.16	0.02
Mc 16	251	22	0.20	0.01
Mc 17	371	46	0.27	0.02
Mc 18	330	42	0.27	0.02

Tal como se muestra en el cuadro 5 la mediana de ORAC fue de 242 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ indicando un valor bajo a lo reportado en especies de Costa Rica, tal como lo demuestra Zamora et al. (2015) para *T. angustula* (1070 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$) y *M. beecheii* (320 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$), así mismo, Espinoza (2015) presenta una mediana de 468 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ para mieles de *S. pectoralis*, siendo el valor de *M. beecheii* la especie que es relativamente parecida a *M. costaricensis*.

Cuadro 5. Mediana, mínimo y máximo de las variables medidas.

VARIABLES	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	CV (%)
ORAC ($\mu\text{mol TE}/100\text{g}$)	242	106	732	51.18
TP ($\mu\text{g GAE}/\text{mg}$)	0.25	0.15	0.51	32.63

Se tienen pocos reportes que determinan el valor ORAC de mieles de abejas sin aguijón, Batista et al. (2016) reportan rangos bajos en mieles de Meliponas procedentes de Brasil (9-54.3 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$), estos valores se encuentran por debajo de los reportados en este trabajo.

Por otro lado, los valores de TP, mostraron un mínimo de 0.15 $\mu\text{g GAE}/\text{mg}$ correspondiendo tanto a la muestra Mc 02 (Atenas) como a Mc 05 (Turrúcares, Alajuela), y un máximo de 0.51 $\mu\text{g GAE}/\text{mg}$ para la muestra Mc 08 (Calle Valverde, Pérez Zeledón). La mediana (0.25 $\mu\text{g GAE}/\text{mg}$) tiende a ser muy baja a comparación de las mieles en Costa Rica, Zamora et al. (2015) reportan valores de 1.77 $\mu\text{g GAE}/\text{mg}$ para *T. angustula* y 0.54 $\mu\text{g GAE}/\text{mg}$ para *M. beecheii*, corroborando que estos valores son altamente significativos ($p < 0,05$), es decir, estadísticamente son diferentes los datos entre estas especies. Así mismo, Espinoza (2015) destaca un valor de 0.59 $\mu\text{g GAE}/\text{mg}$ para mieles de *S. pectoralis*.

Hay estudios que se han realizado en otros países en los que se ha encontrado valores relativamente similares, tal es el caso de Biluca et al. (2016) en mieles de Brasil, muestran valores de 0.10-0.98 $\mu\text{g GAE}/\text{mg}$, siendo estos más bajos en las mieles del género Melipona y altos en el género Tetragonisca. De Almeida et al. 2013 encontraron también valores bajos en mieles de Meliponas en diferentes sitios de Brasil (0.17-0.66 $\mu\text{g GAE}/\text{mg}$). De lo contrario, también se han reportado valores altos en mieles de este

género que van de 1.27, 1.16, 0.80 y 0.61 $\mu\text{g GAE/mg}$ (Sarmiento et al., 2013; Batista et al., 2016). Por otro lado, se tienen reporte de otras especies de abejas como *S. mexicana*, Jiménez et al. (2016) reportan valores similares (0.25-0.40 $\mu\text{g GAE/mg}$) como los encontrados en este estudio.

Ambas variables mostraron un coeficiente de variación alto, es decir, hubo una alta variabilidad entre los datos de dichas muestras. Por otro lado, la correlación de Pearson (Cuadro 6) fue positiva entre ORAC y fenólicos totales (0.756), siendo altamente significativo ($p < 0.001$), esto sugiere que la capacidad antioxidante de las mieles de *M. costaricensis* está representado en un 75.6 % por los compuestos fenólicos de dichas muestras, mostrando similitud a la relación encontrada por Zamora et al. (2015) y Espinoza (2015).

Cuadro 6. Correlación de Pearson

CORRELACIÓN DE PEARSON	
ORAC	0.756
TP	$p < 0.001$

Los antioxidantes son sustancias que previenen o retrasan los daños celulares, estos los podemos encontrar tanto en frutas y verduras. El melón en particular tiene una capacidad antioxidante de 241 $\mu\text{mol TE/100g}$, siendo un valor parecido a la mediana que se obtuvo en este estudio, así también el pepino presenta un valor cercano (372 $\mu\text{mol TE/100g}$), sin embargo hay alimentos que contienen valores altos de antioxidantes tal es caso del aceite de oliva y el tomate, siendo este último el doble (546 $\mu\text{mol TE/100g}$) de la capacidad que presentaron las mieles analizadas en este estudio (Haytowitz & Bhagwat, 2010).

5.3. Actividad Antimicrobiana

La miel de abeja muestra una amplia gama de actividades antimicrobianas contra varios tipos de bacterias, hongos y virus (Aggadand Guemour, 2014; Cooper et al., 1999; Nasir et al., 2010).

En el cuadro 7 se observa que las muestras Mc 05, Mc 06, Mc 07, Mc 08, Mc 10, Mc 12, Mc 13 y Mc 14 (Alajuela, Pérez Zeledón, Guápiles y San Carlos) mostraron actividad

antimicrobiana contra *S. aureus*, correspondiendo al 44% de las muestras activas y el 56% a las muestras inactivas a este microorganismo (Fig. 2), sin embargo, ninguna tuvo la capacidad de inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa*.

Cuadro 7. Valores de MIC de las muestras de miel de *M. costaricensis* contra las bacterias *S. aureus* y *P. aeruginosa*

MUESTRAS	MIC (mg/ml) <i>S. aureus</i>	MIC (mg/ml) <i>P. aeruginosa</i>
Mc 01	NI	NI
Mc 02	NI	NI
Mc 03	NI	NI
Mc 04	NI	NI
Mc 05	125	NI
Mc 06	62.5	NI
Mc 07	250	NI
Mc 08	250	NI
Mc 09	NI	NI
Mc 10	250	NI
Mc 11	NI	NI
Mc 12	62.5	NI
Mc 13	62.5	NI
Mc 14	*31.2	NI
Mc 15	NI	NI
Mc 16	NI	NI
Mc 17	NI	NI
Mc 18	NI	NI

NI=No inhibió, *Valor bajo=Mayor inhibición

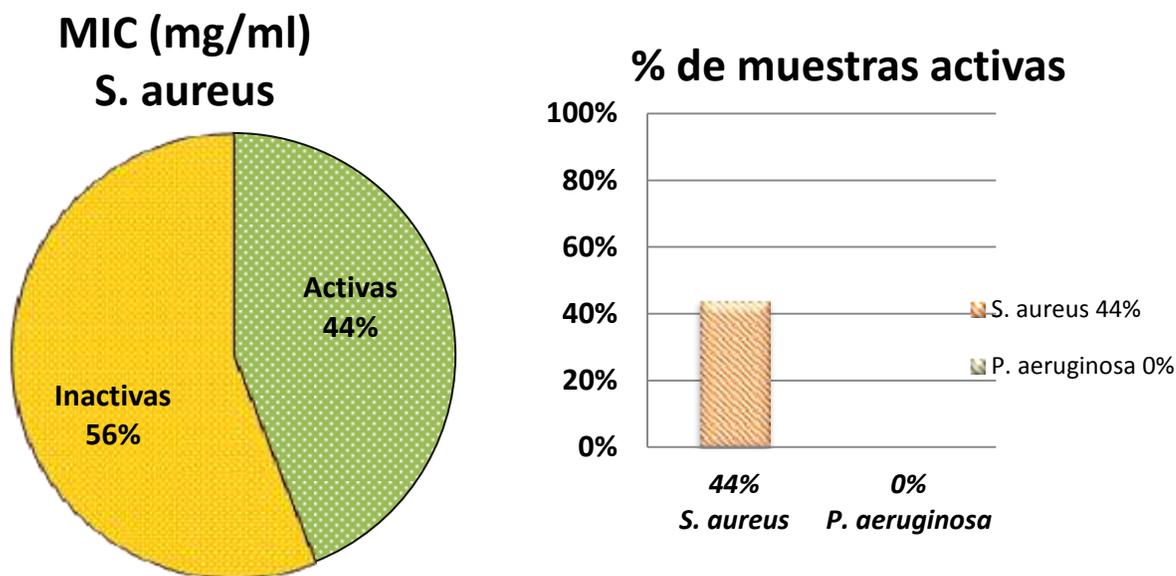


Figura 2. Porcentaje de muestras activas con *S. aureus* y *P. aeruginosa*

Por otro lado, la mediana contra *S. aureus* tuvo un valor de 93.8, siendo el mínimo 31.2 y el máximo 250 (Cuadro 8), cabe destacar que el valor mínimo corresponde a la muestra que presentó mayor efecto antimicrobiano, dicha miel procedente de San Carlos (Mc 14). Zamora et al. (2014) reportan medianas de 49.2, 24.5 y 103.8 en muestras de *T. angustula*, *M. beecheii* y *M. costaricensis* respectivamente, estos autores compararon dichos resultados con MedihoneyTM mostrando una mediana de 101.9 siendo un valor parecido a las mieles de *M. costaricensis*.

Cuadro 8. Mediana, mínimo y máximo del MIC de las mieles de *M. costaricensis* contra *S. aureus*

VARIABLE	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
MIC (mg/ml)	93.8	31.2	250

En la fig. 3 podemos observar las ocho muestras que presentaron actividad antimicrobiana, así mismo las medianas tanto de MDHY, la reportada por Zamora et al., 2014 y la obtenida en este estudio, corroborando ser valores muy similares.

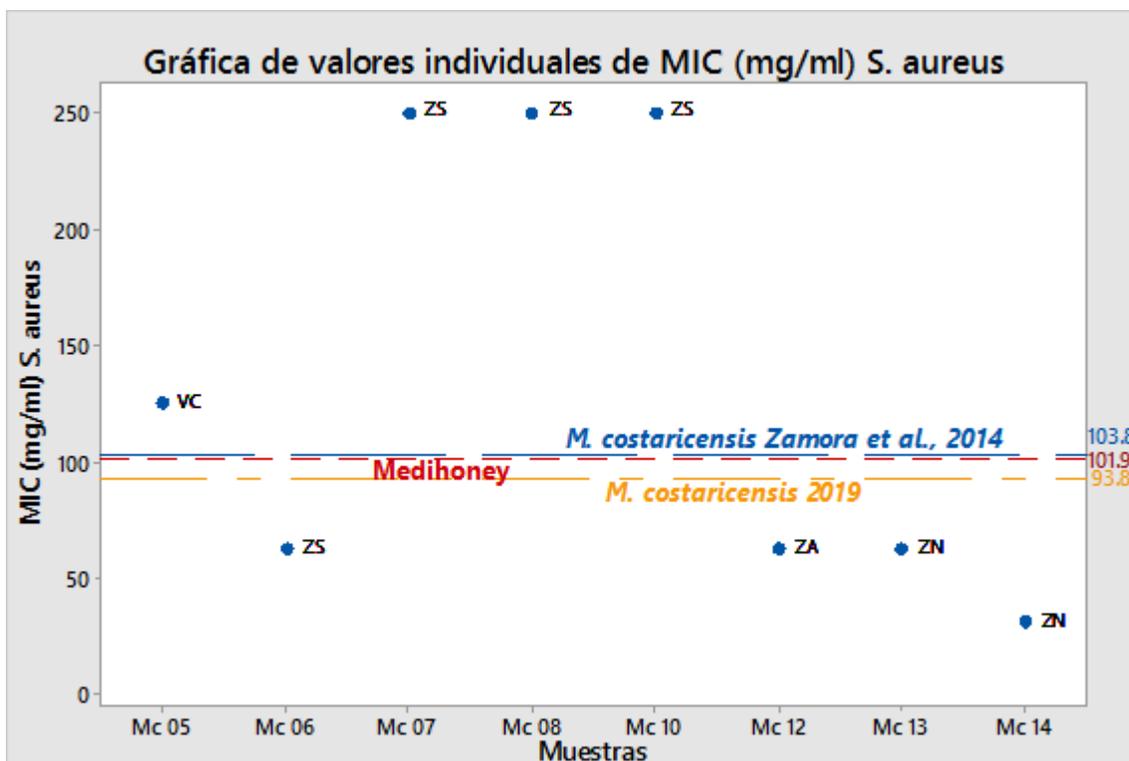


Figura 3. Mediana de MDHY, *M. costaricensis* 2014 VS *M. costaricensis* 2019

Así mismo, se compararon los porcentajes de las mieles que obtuvieron un MIC igual o menor a Medihoney (Cuadro 9), el 44% del total de las mieles activas presentaron un valor más alto (250 mg/ml) que MDHY, por otro lado, el 22% de las muestras mostraron ser menores (62.5 y 31.2 mg/ml respectivamente). Sin embargo, Zamora et al. 2014 reporta que el 90% de las mieles analizadas de *T. angustula* y *M. beecheii* presentaron actividad contra las mismas bacterias utilizadas en este estudio, con un MIC inferior a MedihoneyTM, así mismo MDHY no pudo inhibir el crecimiento de *C. albicans* mientras que las mieles de *T. angustula* si lo hicieron, siendo el 53% de las mieles que inhibieron este microorganismo, hoy en día esta miel es considerada la más potente en Costa Rica.

Cuadro 9. Porcentaje de las mieles reportadas de *T. angustula*, *Melipona beecheii* y *M. costaricensis* con un MIC \leq de Medihoney

Muestras de miel de abejas sin aguijón	Microorganismos			
	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	Total (%)	<MDHY (%)	Total (%)	<MDHY (%)
<i>Tetragonisca angustula</i> (n= 36)	94	92	97	97
<i>Melipona beecheii</i> (n= 21)	95	90	100	100
<i>Melipona costaricensis</i> (n= 18)	44	22	0	0

En la figura 4, se observa un panorama más amplio de las muestras agrupadas por zona de colecta con su respectivo valor MIC, dando lugar a las mieles con mayor actividad antimicrobiana en la parte inferior y en la superior las inactivas.

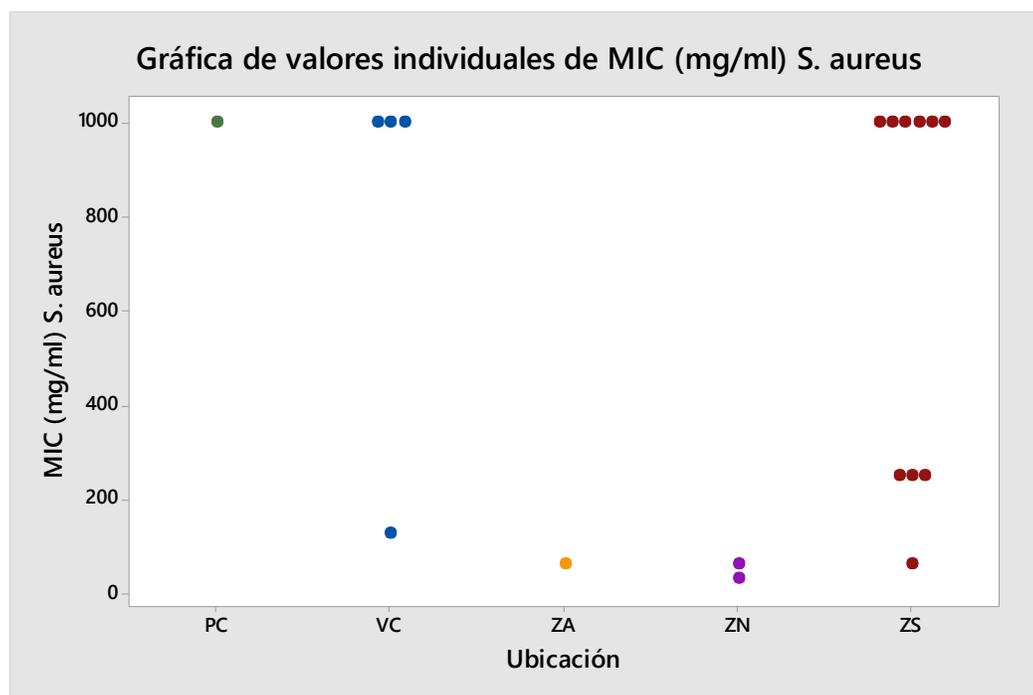


Figura 4. Distribución del MIC de las mieles por zonas de ubicación

Varios autores coinciden que la actividad antimicrobiana de la miel de abeja sin aguijón tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias gram-positivas y gram-negativas (Pimentel et al., 2013). Esto puede ser efecto de ciertos metabolitos como enzimas, bacterias y componentes fitoquímicos que la abeja puede añadir durante el proceso de néctar a miel (de Bruijn y Sommeijer de 1997, Dardón y Enríquez, 2008, Nogueira-Neto, 1997, Temaru et al., 2007). No obstante en este estudio no se evidenció actividad contra la bacteria *P. aeruginosa* la cual es gram-negativa.

Sin embargo, una característica en particular de la miel de abeja sin aguijón es que se almacena en potes de cerumen hechas principalmente de cera y propóleo, Choudhari et al. (2012) encontraron que el propóleo tiene una propiedad antimicrobiana convincente, lo que también puede dar lugar al efecto antimicrobiano de dichas mieles.

6. COMPONENTES PRINCIPALES

Según el análisis de componentes principales (ACP) el primer componente explica el 63% del total de la variabilidad de los datos obtenidos, en el primer gráfico de la figura 5 podemos observar que los parámetros densidad, contenido de agua y acidez libre tienen mayor impacto en el primer componente, siendo estos dos últimos de manera negativa, sin embargo, prolina y MIC presentan menor peso en este mismo componente. Por otro lado, los parámetros ORAC y TP se ubican de manera positiva en el segundo componente mostrando un fuerte impacto.

En el segundo gráfico se observa la distribución de cada muestra, la mayoría de las mieles se encuentran dispersas entre sí, lo cual no permite determinar si dichas mieles tienen alta o baja actividad de acuerdo a las diferentes zonas de muestreo. El gráfico de la actividad antioxidante presenta las muestras que tuvieron mayor contenido en los cuadrantes superior e inferior derecho (2 y 4), sin embargo los valores MIC de la siguiente gráfica que se encuentran en estos mismo cuadrantes representan las mieles con bajo o las que no tuvieron efecto antimicrobiano y las que se encuentran del lado opuesto son las que mayor actividad mostraron.

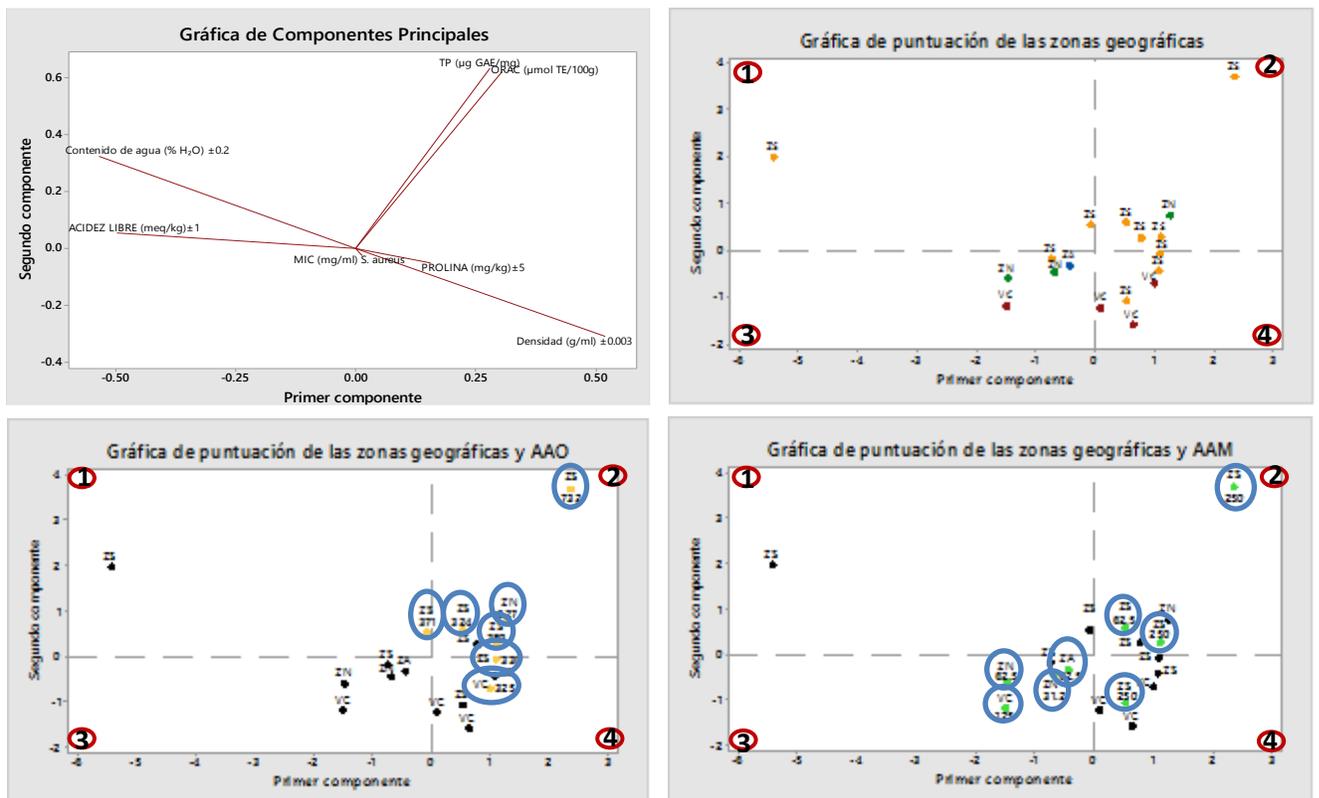


Figura 5. Análisis de componentes principales de las muestras de miel de *M. costaricensis* por zonas geográficas.

Así mismo, en la Cuadro 10 claramente se observa que la densidad, el contenido de agua y la acidez, inciden principalmente en el PC 1, sin embargo, ORAC y TP tienen un fuerte impacto en el PC 2.

Cuadro 10. Variables medidas y su coeficiente en el PC1 y PC2

VARIABLE	COEFICIENTE PC1	COEFICIENTE PC2
Densidad	0.521	-0.308
Contenido de agua	-0.534	0.324
Acidez libre	-0.497	0.056
Prolina	0.156	-0.050
ORAC	0.307	0.625
TP	0.280	0.635
MIC	0.014	-0.024

En el análisis de correlación de Pearson, tres variables presentaron altas diferencias significativas (Cuadro 11). Los parámetros de densidad y contenido de agua presentan alta correlación negativa (coeficiente de Pearson= -0.973 $p<0.05$), es decir, están fuertemente relacionados entre sí, caso similar a lo reportado en otros estudios (Zamora et al., 2014; Espinoza, 2015), esto nos indica que para realizar tanto actividad antioxidante y antimicrobiana en estas mieles es necesario determinar estos dos parámetros.

Así mismo, la acidez y la densidad presentan correlación negativa (coeficiente de Pearson= -0.633 con un $p<0.05$), es decir a medida que uno de ellos aumenta el otro disminuye, sin embargo, la acidez libre y el contenido de agua muestran una correlación positiva (coeficiente de Pearson= 0.729 $p<0.05$), es decir se comportan de manera proporcional (si uno aumenta el otro también lo hará), caso similar se demuestra con ORAC y TP presentando correlación positiva (coeficiente de Pearson= 0.751 $p<0.05$), sugiriendo que la capacidad antioxidante de estas mieles está dado por los compuestos fenólicos.

Cuadro 11. Correlación de Pearson de las variables medidas en las muestras de miel de *M. costaricensis*.

	Densidad	Contenido de agua	Acidez libre	Prolina	ORAC	TP
Contenido de agua	-0.973					
	0.000					
ACIDEZ LIBRE	-0.633	0.729				
	0.005	0.001				
PROLINA	0.238	-0.212	0.014			
	0.342	0.399	0.955			
ORAC	0.124	-0.159	-0.405	-0.007		
	0.624	0.529	0.096	0.979		
TP	0.163	-0.098	-0.235	0.194		
	0.517	0.698	0.348	0.441		
MIC	-0.131	0.027	-0.162	0.271		
	0.604	0.916	0.520	0.277		
TP					0.751	
					0.000	
MIC					0.119	-0.181
					0.639	0.473

*Valor de p (<0.05)= estadísticamente significativo.

Con lo observado anteriormente, es importante seleccionar este tipo de mieles por medio de la capacidad antioxidante y proporcionarles un valor agregado, ya que en estas determinaciones tanto en ORAC y TP se encontró mayor segregación de los datos.

El valor agregado para estas mieles puede ser con fines alimenticios (ensalada de frutas o solo el consumo de esta miel) ya que como se menciona anteriormente estas mieles mostraron una actividad antioxidante parecido a un melón y cercano a un pepino, este último puede usarse con fines cosméticos, en la elaboración de alguna crema a base de pepino y miel de *M. costaricensis*, la cual tendrá la capacidad de bloquear o retrasar los signos del envejecimiento prematuro, que causan los radicales libres.

7. CONCLUSIONES

- ✚ En este estudio se encontró una correlación entre los parámetros densidad y actividad de agua, estos son muy importantes para realizar cualquier determinación en estas mieles.
- ✚ Todas las mieles analizadas en esta investigación presentaron capacidad antioxidante, destacando principalmente las mieles de la zona del Sur del país donde se muestra en la sección de resultados, las variables ORAC y TP estuvieron estrechamente relacionadas entre sí, lo que indica que la actividad antioxidante se debe al contenido de compuestos fenólicos. Esta actividad está dada por su origen botánico.
- ✚ Sólo 8 de las mieles estudiadas presentaron actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, y 4 de ellas tuvieron un valor de MIC bajo (mayor actividad) a comparación de Medihoney®. Sin embargo, todas las muestras analizadas no presentaron actividad contra *P. aeruginosa*. Estas mieles no tienen una actividad antimicrobiana de amplio espectro.
- ✚ La capacidad antioxidante de estas mieles se compararon con alimentos reportados en la literatura, siendo el Melón y el pepino las fruta con la capacidad antioxidante parecidas al de estas muestras.
- ✚ El valor agregado para estas mieles por medio de los análisis realizados en este estudio es con fines alimenticios y en la preparación de cremas faciales o corporales con el objetivo de retardar el deterioro de nuestras células causado por los radicales libres.

8. RECOMENDACIONES

- ✚ Analizar también actividad enzimática, HMF, minerales y azúcares, para saber si otros parámetros están correlacionados entre sí.
- ✚ Realizar un estudio del origen botánico y saber qué plantas le están proporcionando la capacidad antioxidante a dichas mieles.
- ✚ Con esta investigación se pueden seleccionar las mieles con mayor capacidad antioxidante para que los meliponicultores puedan darle un valor agregado.

9. BIBLIOGRAFÍA

- ✚ Acquarone, C., Buera, P., Elizalde, B., 2007. Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food Chemistry* 101, 695–703.
- ✚ Aggad, H. & Guemour, D., 2014. Honey antibacterial activity. *Med. Aromat. Plants* 3, <http://dx.doi.org/10.4172/2167-0412.1000152>.
- ✚ Al Somal, N., Coley, K., Molan, P., Hancock, B. (1994). Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of manuka honey. *J. R. Soc. Med.* 87, 9–12.
- ✚ Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., Brenciani, A., Mazzoni, L., Gasparrini, M., González-Paramás, A. M., et al. (2018). Apis mellifera vs Melipona beecheii Cuban polyfloral honeys: A comparison based on their physicochemical parameters, chemical composition and biological properties. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie Food Science and Technology*, 87, 272–279.
- ✚ Ávila, 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(August), 37–50.
- ✚ Aziz, M. S. A., Giribabu, N., Rao, P. V., & Salleh, N. (2017). Pancreatoprotective effects of *Geniotrigona thoracica* stingless bee honey in streptozotocinnicotinamide induced male diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy Biomedecine & Pharmacotherapie*, 89(May), 135–145.
- ✚ Batista, J., Leite, E., Marques, G., de Toledo, M., Gullón, B., Pintado, M. & Magnani, M. (2016). Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. *Food Science and Technology*, 65, 645-651.
- ✚ Biluca, F., Braghini, F., Gonzaga, L., Oliveira, A. & Fett, R. (2016). Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (Maliponinae). *Journal of Composition and Analysis* SO 61-69.
- ✚ Bogdanov, S., Lüllmann, C., Martin, P., von der Ohe, W., Russmann, H., Vorwohl, G., Persano Oddo, L., Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., Piro, R., Flamini, C., Morlot, M., Lheretier, J., Borneck, R., Marioleas, P., Tsigouri, A., Kerkvliet, J., Ortiz, A.,

- Ivanov, T., D'Arcy, B., Mossel, & B., Vit, P. (1999). Honey quality and International regulatory standards: review of the International Honey Commission." *Bee world*, 80(2), 61-69.
- ✚ Bogdanov, S. (2009). Harmonized methods of the International Honey Commission.
 - ✚ Camargo, JMF, Pedro, SRM, Moure, J.S., Urban, D. (2013). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. 1836. Online version.
 - ✚ Choudhari, M.K., Haghniaz, R., Rajwade, J.M., Paknikar, K.M., 2013. Anticancer activity of Indian stingless bee propolis: an in vitro study. *Evid-Based Complement. Altern. Med.*, 2013.
 - ✚ Cooper, R., Molan, P., Harding, K., 1999. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. *J. R. Soc. Med.* 92, 283–285.
 - ✚ Costa, A. C. V. da, Sousa, J. M. B., Silva, M. A. A. P. da, Garruti, D. dos S., & Madruga, M. S. (2017). Sensory and volatile profiles of monofloral honeys produced by native stingless bees of the Brazilian semiarid region. *Food Research International*, 105(March), 110–120.
 - ✚ da Silva, I.A.A., da Silva, T.M.S., Camara, C.A., Queiroz, N., Magnani, M., de Novais, J.S., Soledade, L.E.B., de Oliveira Lima, E., de Souza, A.L., de Souza, A.G. (2013). Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless beehoney from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chem.* 141, 3552–3558.
 - ✚ Dardón MJ & Enriquez E. (2008). Caracterización fisicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (Meliponini) de Guatemala. *INTERCIENCIA*. Vol. 33.
 - ✚ de Almeida-Muradian, L. B., Stramm, K. M., Horita, A., Barth, O. M., Da Silva de Freitas, A., & Estevinho, L. M. (2013). Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(8), 1698–1706.
 - ✚ De Bruijn, L L M; Sommeijer, M J. (1997). The composition and properties of honeys of stingless bees (*Melipona*). In M J Sommeijer; J Beetsma; W J Boot; E J Robberts; R De Vries (Eds). *Perspectives for honey production in the tropics:*

proceedings of the Netherlands Expertise Centre for Tropical Apicultural Resources (NECTAR). Utrecht University; Utrecht, The Netherlands. pp. 139-148.

- ✚ De Mera, J.H., Angert, E.R. (2004). Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phytogeographic regions of Costa Rica. *Apidologie* 35, 411–417.
- ✚ El Denshary, E.S., Al-Gahazali, M.A., Mannaa, F.A., Salem, H.A., Hassan, N.S., Abdel-Wahhab, M.A. (2012). Dietary honey and ginseng protect against carbontetrachloride-induced hepatonephrotoxicity in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 64,753–760.
- ✚ El-Arab, A.M.E., Girgis, S.M., Hegazy, E.M., El-Khalek, A.B.A. (2006). Effect of dietary honey on intestinal microflora and toxicity of mycotoxins in mice. *BMC Complement. Altern. Med.* 6, 6.
- ✚ EL-Kholy, W.M., Hassan, H.A., Nour, S.E., Abe Elmageed, Z.E., Matrougui, K. (2009). Hepatoprotective effects of *Nigella sativa* and bees honey on hepatotoxicity induced by administration of sodium nitrite and sunset yellow. *FASEB J.* 23,732–733.
- ✚ Erejuwa, O., Sulaiman, S., Wahab, M., Sirajudeen, K., Salleh, M., Gurtu, S. (2012a). Hepatoprotective effect of tualang honey supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.* 4, 37–41.
- ✚ Escuredo, O., Míguez, M., Fernández-González, M., & Carmen Seijo, M. (2013). Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chemistry*, 138(2–3), 851–856.
- ✚ Espinoza, C., Vázquez, A., Torres, R., López, A., Albores, V & Grajales, J. (2018). Stingless bee honeys from Soconusco, Chiapas: a complementary approach. *Revista de Biología Tropical*, 66 (4), 1536-1546.
- ✚ Espinoza, I., Padilla, S., Hernández, P., Benítez, J., Zamora, L., Aguilar, I., Herrera, E. Guía práctica de identificación de abejas nativas sin aguijón (Apidae, Meliponini) por medio de sus entradas. Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar, Centro de investigaciones apícolas tropicales Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

- ✚ Espinoza, I., Veen, J., Zamora, L., Umaña, E., Aguilar, I. (2015). Estudio de la relación entre la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos en mieles de *Scaptotrigona pectoralis* en Costa Rica. Trabajo final práctica profesional II, para optar el grado de Máster en Apicultura Tropical, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- ✚ Figueroa, G., Prendas, J. P., Ramírez, M., Aguilar, I., Herrera, E., Travieso, C. M. (2015). Identificación de abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) a partir de la clasificación de los descriptores SIFT de una imagen del ala derecha anterior. Tecnología en marcha. Edición especial, 51-63.
- ✚ Giordano, A., Retamal, M., Leyton, F., Martínez, P., Velásquez, P., Montenegro, G., Velásquez, P. (2018). Bioactive polyphenols and antioxidant capacity of *Azara petiolaris* and *Azara integrifolia* honeys. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 484–489.
- ✚ Guerrini, A., Bruni, R., Maietti, S., Poli, F., Rossi, D., Paganetto, G., Sacchetti, G. (2009). Ecuadorian stingless bee (Meliponinae) honey: a chemical and functional profile of an ancient health product. *Food Chemistry*, 114, 1413-1420.
- ✚ Harmonised Methods of the International Honey Commission. (2009). Stefan Bogdanov, Bee Product Science, www.bee-hexagon.net
- ✚ Haytowitz, D & Seema, B. (2010). USD Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2. Nutrient Data Laboratory, ARS Y USDA. <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>
- ✚ Howell- Jones, R S; Wilson, M J; Hill, K E; Howard, A J; Price, P E; Thomas, D W. (2005). A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(2): 143-149.
- ✚ Jimenez, M., Beristain, C. I., Azuara, E., Mendoza, M. R., & Pascual, L. A. (2016). Physicochemical and antioxidant properties of honey from *Scaptotrigona mexicana* bee. *Journal of Apicultural Research*, 8839(August), 1–10.
- ✚ Karabagias, I. K., Badeka, A. V., Kontakos, S., Karabournioti, S., & Kontominas, M. G. (2014). Botanical discrimination of Greek unifloral honeys with physicochemical and chemometric analyses. *Food Chemistry*, 165, 181-190.
- ✚ Khalafi, R., Goli, S. A. H., & Isfahani, M. B. (2015). Characterization and classification of several monofloral Iranian honeys based on physicochemical

- properties and antioxidant activity. *International Journal of Food Properties*, 19(5), 1–32.
- ✚ Kishore, R.K., Halim, A.S., Syazana, M.N., Sirajudeen, K. (2011). Tualang honey has higher phenolic content and greater radical scavenging activity compared with other honey sources. *Nutr. Res.* 31, 322–325.
 - ✚ Manzanares, A. B., García, Z. H. B., Galdon, R., Rodríguez, E. R., Romero, C. D. (2014). Physicochemical characteristics of minor monofloral honeys from Tenerife, Spain. *LWT Food Science and Technology*, 55, 572-578.
 - ✚ Marin, I., Torres, R., Grajales, J., Albores, V. (2018). Elucidation of antimicrobial activity of stingless bee honeys from the Soconusco region. Tesis de licenciatura. Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas, México.
 - ✚ McGovern, D., Abbas, S., Vivian, G., Dalton, H. (1999). Manuka honey against *Helicobacter pylori*. *J. R. Soc. Med.* 92, 439.
 - ✚ Miorin, P., Levy Junior, N., Custodio, A., Bretz, W., Marcucci, M. (2003). Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 95, 913–920.
 - ✚ Molan, P. (2001). *Bee World*. Pp 82, 22.
 - ✚ Moo, V., Gonzáles, G., Lira, J., Pérez, E., Estrada, R., Moo, M., Sauri, E. (2015). Physicochemical properties of *Melipona beecheii* honey of the Yucatan Peninsula. *Journal of Food Research*; Vol 4, ISSN 1927-0887.
 - ✚ Nasir, N.-A.M., Halim, A.S., Singh, K.-K.B., Dorai, A.A., Haneef, M.-N.M., 2010. Antibacterial properties of Tualang honey and its effect in burn wound management: a comparative study. *BMC Complement. Altern. Med.* 10, 31.
 - ✚ Nates, G. J., Rosso, M., Cepeda, M., Lugo, J. (2009). Características de la Meliponicultura en Colombia. Laboratorio de investigación en abejas (LABUN). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
 - ✚ NOGUEIRA-NETO, P (1997) As propriedades antibióticas do mel. In P Nogueira-Neto (Ed.). *Vida e Criação de abelhas indígenas sem ferrão*. Editora Nogueirapis; São Paulo, Brazil. pp. 263-278.
 - ✚ Nweze, J. A., Okafor, J. I., Nweze, E. I., & Nweze, J. E. (2016). Pharmacognosy & natural products comparison of antimicrobial potential of honey samples from *Apis*

mellifera and two stingless bees from Nsukka, Nigeria. OMICS International Research Article Nweze J Pharmacogn Nat Prod, 2(4).

- ✚ 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.
- ✚ Osés, S. M., Pascual-Maté, A., de la Fuente, D., de Pablo, A., Fernández-Muiño, M. A., & Sancho, M. T. (2016). Comparison of methods to determine antibacterial activity of honey against *Staphylococcus aureus*. *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences*, 78, 29–33.
- ✚ Pimentel, R., Alves, C., Melchionna, P., Duvoisin, S. (2013). Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manausensis* and commercial honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13:151.
- ✚ Rao, P. V., Krishnan, K. T., Salleh, N., & Gan, S. H. (2016). Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: A comparative review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(5), 1–8.
- ✚ Sancho, M. T., Pascual-Maté, A., Rodríguez-Morales, E. G., Osés, S. M., Escriche, I., Sgariglia, M.A., Vattuone, M.A., Vattuone, M.M.S., Soberón, J.R., Sampietro, D.A. (2010). Properties of honey from *Tetragonisca angustula fiebrigi* and *Plebeia wittmanni* of Argentina. *Apidologie* 41, 667–675.
- ✚ Sarmiento, T., dos Santos, F., Evangelista, A., Sarmiento, E., Sarmiento, G., Santos, J., Ribeiro, F., Amorim, C. (2013). Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaira (*Melipona subnitida*) honey. *Journal of Food Composition and Analysis* 29 10-18.
- ✚ Silva, I. A. A. da, Silva, T. M. S. da, Camara, C. A., Queiroz, N., Magnani, M., Novais, J. S. de, et al. (2013a). Phenolic profile, antioxidant activity and palynological.
- ✚ Souza, K., Augusto, J., Sattler, G., Fagundes, L., Macedo, L., Viviana, C., Almeida muradian, L. B. De. (2018). Phenolic compounds, antioxidant capacity and

physicochemical properties of Brazilian *Apis mellifera* honeys. *LWT – Food Science and Technology*, 91(May), 85–94.

- ✚ Temaru, E., Shimura, S., Amano, K., & Karasawa, T. (2007). Antibacterial activity of honey from stingless honeybees (Hymenoptera; Apidae; Meliponinae). *Polish Journal of Microbiology*, 56(4), 281–285.
- ✚ Vaissière, B., Klein, A., Cane, J., Steffan-Dewenter, I. (2006). Importance of pollinators in changing landscapes for word crops. *Proceedings The Royal Society*, 303-313.
- ✚ Vattuone, M; Quiroga, E; Sgariglia, M; Soberón, J; Jaime, G; Martínez, M; Sampietro, D (2007). Compuestos fenólicos totales, flavonoides, prolina y capacidad captadora de radicales libres de mieles de *Tetragonisca angustula* fiebrigi (Schwarz, 1938) y de *Plebeia wittmanni*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales*. Chile. pp. 299-300.
- ✚ Vit, P. (2013). *Melipona favosa* pot-honey from Venezuela. Pot honey a legacy of stingless bees. New York: Springer.
- ✚ Vit, P., Gutiérrez, M., Titera, D., Bednar, M. & Rodríguez, A. (2008). Mieles checas categorizadas según su actividad antioxidante. *Biomédica clínica. Acta Bioquím Clin*; 42 (2): 237-44.
- ✚ Vit, P., Medina, M., Enríquez, E. (2004). Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *Bee World*, 85:2-5.
- ✚ Zamora, L; Beukelman, C; Van den Berg, A; Arias, M; Umaña, E; Aguilar, I; Quarles van Ufford, H; Van den Worm, E; Fallas, N; Solórzano, R (2014). The antimicrobial activity and microbiological safety of stingless bee honeys from Costa Rica. *Journal of Apicultural Research* 53(5): 503-513.
- ✚ Zamora, L; Beukelman, C; Van den Berg, A; Arias, M; Umaña, E; Aguilar, I; Quarles van Ufford, H; Van den Worm, E; Fallas, N; Solórzano, R (2015). The antioxidant capacity and immunomodulatory activity of stingless bee honeys proceeding from Costa Rica. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, 4 (1), 49-55

10. ANEXO

CONSENTIMIENTO INFORMADO PREVIO

Permiso de ingreso a propiedad

Fecha: _____

Por este medio el suscrito (a) _____, con cédula de identidad _____, en mi condición de meliponicultor autorizo a los investigadores Cristina Espinoza Toledo y Eduardo Herrera Gonzáles a que ingresen a mi meliponario.

Firma: _____

Cédula: _____

Fecha: _____

Permiso de toma de muestra

Fecha: _____

Por este medio el suscrito (a) _____ con cédula de identidad _____, en mi condición de meliponicultor, autorizo a los investigadores Cristina Espinoza Toledo y Eduardo Herrera Gonzáles a que colecten muestras de mi meliponario como parte del trabajo final de graduación titulado "Evaluación de la capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana de mieles de *Melipona costaricensis* en Costa Rica" como requisito para optar el grado de maestría profesional en Apicultura Tropical del Centro de Invesigaciones Apícolas Tropicales de la Universidad Nacional de Costa Rica.

Firma: _____

Cédula: _____

Fecha: _____

Permiso de toma de muestra

Fecha: _____

Por este medio el suscrito (a) _____ con cédula de identidad _____, autorizo a los investigadores Cristina Espinoza Toledo y Eduardo Herrera Gonzáles a que utilicen las muestras que se colectaron de mi meliponario como objeto del trabajo final de graduación titulado "Evaluación de la capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana de mieles de *Melipona costaricensis* en Costa Rica". A su vez, autorizo al Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales de la Universidad Nacional de Costa Rica la custodia de las muestras y su utilización en futuras actividades de investigación.

Firma: _____

Cédula: _____

Fecha: _____