



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

TESIS

**“OPTIMIZACIÓN DE UN PROCESO DE SECADO POR ASPERSIÓN PARA
LA OBTENCIÓN DE UN PRODUCTO EN POLVO DE MIEL DE *Melipona
beechei*”**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:
IBQ. DANIEL BOLÍVAR MORENO**

**ASESOR:
DR. LUIS FERNANDO CUEVAS GLORY**

**MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO.
16 DE NOVIEMBRE DE 2017**



DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
No. DE OFICIO: X-462/2017

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

MÉRIDA, YUCATÁN A 26 DE OCTUBRE DE 2017

C. BOLIVAR MORENO DANIEL
Pasante de Maestría en Ciencias de los
Alimentos y Biotecnología
P r e s e n t e.

De acuerdo al fallo emitido por su asesor el Dr. Luis Fernando Cuevas Glory y la comisión revisora integrada por Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez, el Dr. Enrique Sauri Duch y la Dra. Odri Marina Sosa Moguel, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

"OPTIMIZACIÓN DE UN PROCESO DE SECADO POR ASPERSIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE UN PRODUCTO EN
POLVO DE MIEL DE *Melipona beecheii*"

ATENTAMENTE
IN HOC SIGNO VINCES

M.C. DANIEL ARCANGEL LÓPEZ SAURI
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Archivo
DALs/tja



S. E. P.
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE MÉRIDA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



DEDICATORIAS

Primero a Dios y San Diego de Alcalá por guiarme a lo largo de la vida y permitirme cumplir una más de mis metas.

A mis hermanas por todo su amor y apoyo brindado.

Por último y de manera muy especial, a mis padres José y Concepción por ser un ejemplo de vida, por brindarme todo su amor y apoyo incondicional, por estar siempre pendientes de mi preparación para salir siempre adelante.

AGRADECIMIENTOS

Al ITMérida y a la División de Estudios de Posgrado por permitirme trabajar en sus instalaciones para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Luis Cuevas Glory, director de esta tesis, por su amistad, que con su inestimable ayuda, dedicación y apoyo, ha hecho posible la realización de este trabajo.

A la Dra. Elizabeth Ortiz Vázquez y al Dr. Enrique Sauri Duch por su valiosa asesoría, dirección y apoyo incondicional.

A la Dra. Odri Sosa Moguel por su paciencia, por su apoyo incondicional, por sus conocimientos brindados, por su amistad.

A mi buen amigo M.C. Jesús Ramón Sierra por su apoyo desmedido, sus experiencias y conocimientos pero sobre todo por la amistad brindada.

Y a todos aquellos que de una u otra manera hicieron posible la realización de este trabajo e influyeron positivamente en mí.

ÍNDICE

Resumen	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 La Meliponicultura en la antigüedad	5
2.2 <i>Melipona beecheii</i> (<i>Xunaan Kaab</i>).....	7
2.3 La Miel de las abejas sin aguijón.....	8
2.4 Parámetros físicos y químicos presentes en la miel	11
2.4.1 Humedad.....	12
2.4.2 Azúcares reductores	12
2.4.3 Hidroximetilfurfural (HMF)	12
2.4.4 Cenizas.....	13
2.4.5 pH.....	13
2.4.6 Color	13
2.4.7 Compuestos de volátiles	13
2.4.8 Microextracción en fase sólida (SPME).....	14
2.5 Antioxidantes.....	15
2.5.1 DPPH.....	15
2.5.2 ABTS	16
2.6 Actividad Antimicrobiana	16
2.7 Microencapsulación.....	17
2.7.1 Agentes utilizados para la Microencapsulación	19
2.7.1.1 Carbohidratos.....	19
2.7.1.2 Almidón	19
2.7.1.3 Gomas.....	19
2.7.1.4 Maltodextrinas	20
2.8 Técnicas de encapsulamiento	20
2.8.1 Extrusión.....	20
2.8.2 Secado por aspersion	21
2.8.2 Proceso de secado por aspersion.....	22
2.8.2.1 Matrices de encapsulación	22

2.9 Miel microencapsulada.....	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	25
4. OBJETIVOS.....	26
4.1 Objetivo general	26
4.2 Objetivos específicos.....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1 Estrategia de trabajo	27
5.2 Análisis físicos y químicos de la miel de abeja <i>Melipona beecheii</i>	28
5.2.1 Humedad.....	28
5.2.2 Actividad invertasa.....	28
5.2.3 Determinación de azúcares reductores.....	29
5.2.4 Hidroximetilfurfural (HMF)	29
5.2.5 pH.....	29
5.2.6 °Brix.....	29
5.2.7 Color	30
5.2.8 Determinación de los componentes volátiles	30
5.3 Actividad antioxidante.....	30
5.3.1 ABTS	30
5.3.2 DPPH.....	31
5.4 Actividad antimicrobiana.....	31
5.4.1 Metodología difusión en disco.....	32
5.5 Secado de la miel (Microencapsulación)	33
5.5.1 Preparación de la solución de miel	33
5.5.2 secado por aspersion.....	33
5.5.3 Análisis estadístico	34
5.6 Análisis de miel microencapsulada.....	34
5.6.1 Humedad.....	34
5.6.2 HMF	34
5.6.3 Higroscopicidad	34
5.6.4 Solubilidad	35
5.6.5 Densidad aparente.....	35
5.6.6 Determinación de los componentes volátiles	35

5.6.7 Actividad antioxidante	35
5.6.8 Actividad antimicrobiana del polvo	35
6. RESULTADOS	37
6.1 Características de calidad físicas y químicas de la miel líquida de <i>Melipona beecheii</i>	37
6.2 Determinación de la actividad antimicrobiana mediante difusión en disco	40
6.3 Análisis de los polvos obtenidos de miel de abeja <i>Melipona beecheii</i>	45
6.4 Análisis de superficie de respuesta	48
6.5 Microfotografía del polvo de miel de abeja melipona	50
6.6 Determinación de la actividad antimicrobiana de la miel en polvo	51
6.7 Actividad antioxidante de la miel líquida y miel en polvo	52
7. CONCLUSIONES	55
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de la abeja <i>Melipona beecheii</i>	7
Tabla 2. Aplicaciones de la miel de abejas sin aguijón.....	10
Tabla 3. Comparación de análisis físicos y químicos de diferentes autores de la miel de abeja Melipona	11
Tabla 4. Valores obtenidos del análisis físico y químico de la miel líquida	37
Tabla 5. Compuestos volátiles presentes en la miel de abeja <i>Melipona beecheii</i>	39
Tabla 6. Datos experimentales para el análisis de superficie de respuesta del efecto de las condiciones de procesamiento en la calidad de la miel en polvo de <i>M. beecheii</i>	45
Tabla 7. Criterios asignados para cada variable de respuesta	49
Tabla 8. Actividad antioxidante de la miel de <i>M. beecheii</i>	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Abejas <i>Melipona beecheii</i>	5
Figura 2. Representación de una microcapsula	18
Figura 3. Representación esquemática de los sistemas de encapsulación. (a) Tipo reservorio, (b) tipo matriz, (c) tipo matriz recubierta.	18
Figura 4. Esquema de funcionamiento del equipo de secado por aspersion.	22
Figura 5. Diagrama de flujo de la estrategia general del trabajo.	27
Figura 6. Cromatograma representativo del perfil de volátiles de la miel de abeja <i>Melipona beecheii</i>	39
Figura 7. Actividad antimicrobiana contra <i>S. aureus</i> , en donde el antibiótico es kanamicina y los distintos porcentajes de miel (a). Actividad antimicrobiana contra <i>E. faecalis</i> , en donde el antibiótico es kanamicina al igual que los distintos porcentajes de miel empleados (b).	40
Figura 8. Actividad antimicrobiana contra tres bacterias Gram Negativas: <i>V. cholerae</i> (a), <i>P. aeruginosa</i> (b) y <i>E. coli</i> (c). El control utilizado fue kanamicina y se probaron distintos porcentajes de miel.	41
Figura 9. Comparación del tamaño los halos de inhibición de cada bacteria.	43
Figura 10. Gráfico de superficie de respuesta.	50
Figura 11. Microfotografía del polvo de miel de abeja melipona obtenido por secado por aspersion.	50
Figura 12. Comportamiento de <i>S. Aureus</i> (a) y <i>E. coli</i> (b) crecidas en agar enriquecido con miel en polvo.	51

Resumen

Para preservar la calidad nutrimental y funcional de la miel y prolongar su vida útil de anaquel, se llevó a cabo un estudio de optimización de secado por aspersion. Las muestras de miel de *Melipona beecheii* empleadas en este estudio fueron colectadas en meliponarios plenamente identificados para asegurar la autenticidad del origen entomológico de la miel. Se utilizó una metodología estadística de superficie de respuesta para optimizar el proceso de secado por aspersion para la obtención de un producto en polvo de miel de abeja sin aguijón. Las variables independientes estudiadas fueron temperatura de entrada de aire (110-150°C) y contenido de maltodextrina 10 ED (50-70%) en una suspensión de miel, maltodextrina y agua. La obtención de la miel en polvo se realizó con un equipo de secado por aspersion para investigación. Se determinaron los valores de las variables de respuesta: rendimiento, humedad, retención de volátiles, densidad aparente, higroscopicidad, tiempo de solubilidad y HMF. A través de la técnica estadística de análisis de superficie de respuesta, se pudo obtener las condiciones óptimas de secado de la miel de melipona siguientes: temperatura del aire de entrada, 150 °C; contenido de maltodextrina, 68%. Con estas condiciones, el rendimiento obtenido fue de 45%, el contenido de humedad de 4.9%, la retención de volátiles de 77%, el tiempo de solubilidad de 255 s y el contenido de hidroximetilfurfural (HMF) de 52 mg/kg. Con muestras de miel líquida y en polvo se analizó la actividad antimicrobiana de 5 cepas bacterianas y la actividad antioxidante en 4 porcentaje diferentes de 80%, 60%, 40% y 20%. Se observó que todas las cepas presentaron halo de inhibición a un porcentaje de 80%, al igual que una concentración del 20% con la miel líquida. Para la miel en polvo, se empleó la técnica de dilución en agar en la que se evaluaron dos cepas. Sin embargo, no hubo efecto inhibitorio ya las bacterias crecieron en el medio enriquecido.

La actividad antioxidante presentó los resultados siguientes: para la miel líquida $31.53 \pm 0.4388 \mu\text{mol ET } 100 \text{ g}$ en ABTS y $3.75 \pm 0.0350 \mu\text{mol ET } 100\text{g}$ para DPPH, la actividad antioxidante para ABTS de la miel en polvo reconstituida fue mayor que la miel líquida con un valor de $38.79 \pm 2.35 \mu\text{mol ET } 100 \text{ g}$.

1. INTRODUCCIÓN

La miel es aquella sustancia dulce natural producida por las abejas a partir del néctar de las flores o de secreciones de otras partes vivas de la planta, que las abejas recogen, transforman, combinan con sustancias específicas propias y almacenan en panales, de los cuales se extrae el producto sin ninguna adición (Anónimo, 1984).

En la antigüedad, para nuestros antepasados americanos, este producto fue una de las primeras fuentes de azúcares (Buarque de Holanda, 1957). Por lo cual el uso de la miel de abejas nativas sin aguijón, en la época prehispánica y el papel que desempeñaron en la dieta de las comunidades indígenas americanas fue muy importante (Medina y Gonzales, 1995).

Existen aproximadamente 20,000 especies de abejas en el mundo. Actualmente se conocen alrededor de 500 especies de abejas sin aguijón de las cuales se ubican en unos 50 géneros. De estos, cerca de 300 especies (30 géneros) se encuentran en el continente americano, 40 (14 géneros) en el sureste de Asia, 50 (10 géneros) en África, 4 (1 género) en la Isla de Madagascar y 10 (2 géneros) en Australia (Velthuis, 1997).

En México, existen 46 especies de estas abejas (Ayala, 1999), de las cuales, en la península de Yucatán, se han logrado identificar 16 (Quezada-Euán, 2005). La especie de abeja *Melipona beecheii* conocida en lengua maya como *Xunaan Kaab* fue la más domesticada y explotada por los antiguos mayas, mucho antes de que los españoles conquistaran Mesoamérica. Sin embargo, las demás especies también eran aprovechadas a través de sus recursos (miel, polen) desde sus nidos. Las abejas Meliponas son silvestres y se caracterizan por producir cera de altísima calidad, miel muy valorada económicamente, sabrosa y utilizada por sus propiedades en el uso medicinal. Posee una gran actividad antibacteriana pero sobre todo su uso medicinal se basa a nivel oftalmológica, debido a su alto contenido de alcaloides, flavonoides (Medina, 1998) y antioxidantes.

La meliponicultura (cultivo de las abejas sin aguijón) fue una actividad de gran importancia en los pueblos mesoamericanos. Desde antes de la llegada de los españoles (Murillo, 1981) los mayas desarrollaron el conocimiento y manejo de la abeja *Melipona beecheii* (Echazarreta *et al.*, 1997).

Con la introducción de la abeja *Apis mellifera* y la apicultura moderna (cría y manejo de abejas *Apis*) a Yucatán, a fines del siglo pasado y principios del presente, a través de los Estados Unidos de Norteamérica (Martínez 1938; Labougle y Zozaya, 1986) con la finalidad de aprovechar todos los recursos apibotánicos de la península, se originó el desarrollo de la actividad apícola con un enfoque orientado al comercio hacia el mercado externo, ocasionando que la actividad que los mayas fuera olvidada, lo que ha ocasionado la casi desaparición de la actividad melipónica.

En la actualidad, la miel de Melipona tiene gran demanda pero debido a que el número de colmenas se ha reducido con el tiempo, no ha sido fácil satisfacer en su totalidad el mercado, lo cual ha ocasionado que el precio se haya elevado a niveles 10 veces mayor al precio de la miel de *Apis mellifera*.

En este trabajo se presenta información científica obtenida de las propiedades físicas y químicas de la miel microencapsulada así como de su actividad biológica. Se realizó la comparación de estas propiedades con las de la miel líquida con la finalidad identificar la variabilidad de las propiedades alimenticias y terapéuticas de este tipo de miel en ambas formas.

2. ANTECEDENTES

2.1 La Meliponicultura en la antigüedad

La crianza de las abejas sin aguijón, actividad conocida como meliponicultura, ha venido desapareciendo en las últimas décadas, principalmente por la tala de los árboles en los bosques tropicales. Estas abejas sin aguijón juegan un papel muy importante como polinizadoras de muchas plantas con flor (Roubik, 1989).

La meliponicultura en México se remonta a tiempos precolombinos y tuvo una importancia económica, cosmogónica y farmacéutica de gran relevancia para las culturas indígenas de la región (Medina y González, 1995). Desde esos tiempos, la *Melipona beecheii* o *Xunaan Kaab* (Figura 1) en lengua maya fue cultivada en gran escala en la península de Yucatán.



Figura 1. Abejas *Melipona beecheii*.

La evidencia más importante del significado de la abeja Melipona entre los mayas, la encontramos en forma contundente, en el contenido del Códice Trocortesiano o de Madrid, ya que sus últimas páginas están dedicadas a la meliponicultura.

Para los mayas Yucatecos, las abejas y sus colmenas eran concebidas como algo sagrado, otorgado por los dioses (Tec y Bocara, 1980) poniéndose incondicionalmente a su servicio. Deidades como “*Ah Mucen Kab*” y “*Jobnil*” (representaciones en códices, y en la cerámica precolombina maya) eran consideradas protectoras de los colmenares mayas. Para propiciar buenas cosechas de miel tenían rituales como el “*U jaanli Kaab*” en los que se le rogaba a los dioses mayas a través de rezos, por la expresión de las floraciones. Este concepto aún prevalece en parte entre los campesinos indígenas actuales.

Actualmente en Yucatán a la unidad productiva se le denomina meliponario, la cual está compuesta de 5 hasta 50 o más *jobones* (colmenas en troncos huecos). En la región litoral oeste de Yucatán, el promedio es de 13 productores (Carrillo, 1993).

Los *jobones* son colocados en chozas construidas ex-profeso, a las que se les denomina *na 'ajil kaab* (Carrillo, 1998), en su interior se construyen 2 perchas en ángulo aproximado de 45 grados, colocándose travesaños paralelos en forma de escalera, donde se asientan los jobones unos encima de otros, la primera línea se coloca a una altura no menor a 25 centímetros del suelo. Todo este espacio debe estar techado en forma tradicional con hojas de palma (*Sabal yapa*) y desprovisto de paredes, obedeciendo una orientación este-oeste en su eje longitudinal.

La meliponicultura es una actividad a que ha venido desapareciendo paulatinamente de los solares mayas o huertos familiares, las consecuencias de este fenómeno, al parecer han sido negativas, tanto en el núcleo familiar, en la dinámica cultural de las comunidades indígenas y en el mediano y largo plazo, en la conservación de la biodiversidad.

2.2 *Melipona beecheii* (Xunaan Kaab)

Las abejas Meliponas, son insectos altamente sociales que habitan en las regiones tropicales del planeta (Michener, 1974). Las abejas sin aguijón producen miel en las regiones tropicales y subtropicales (Crane, 1992). Estos himenópteros pertenecen a la tribu *Meliponini*, se distribuyen entre el hemisferio norte 23.5 °N (Trópico de Cáncer) y las regiones templadas del hemisferio sur 35 °S (Australia y América del Sur) y 28 °S en África (Michener 2000, Yañez-Ordoñez *et al.*, 2008). Según Rosso y Nates (2005), las abejas mayas son nativas de América, las cuales fueron cultivadas por los mayas desde tiempos remotos y por distintas tribus de América. Los mayas cosechaban la miel dos veces al año para no matar la colmena, la miel era utilizada por los sacerdotes para las ceremonias religiosas (LiveScience, 2005).

La especie *Melipona beecheii* (Tabla 1) es la mayormente domesticada y explotada con técnicas tradicionales en los tres estados de la península de Yucatán. La abeja nativa en estado silvestre habita en cavidades de árboles vivos (González, 1984).

Tabla 1. Taxonomía de la abeja *Melipona beecheii*

Clasificación de la <i>Melipona beecheii</i>	
Reino	<i>Animalia</i>
Filo	<i>Artrópoda</i>
Clase	<i>Insecta</i>
Orden	<i>Hymenoptera</i>
Sub-orden	<i>Apócrita</i>
Superfamilia	<i>Apoidea</i>
Familia	<i>Apidae</i>
Sub-familia	<i>Meliponinae</i>
Tribu	<i>Meliponini</i>
Genero	<i>Melipona</i>
Especie	<i>Melipona beecheii</i>

(Michener, 2000)

Una de las características anatómicas principal de las abejas nativas es la ausencia de un aguijón funcional es decir que las obreras y reinas solo poseen vestigios de lo que en el pasado fue el aguijón (González, 1984).

Las abejas recolectan néctar de las flores y por deshidratación y acción enzimática es transformada en miel que es almacenada en los panales de la colmena. La mayoría de las abejas obtienen su alimentación de los productos de las flores que pecorean, de igual forma recolectan polen que les sirve de alimento a las abejas adultas.

2.3 La Miel de las abejas sin aguijón

La composición, el aspecto, el sabor, el color, etc. varían mucho dependiendo de las flores que proviene, de su origen, de la región y de su madurez.

La miel se define como la sustancia natural dulce producida por la abejas a partir del néctar de las plantas o de secreciones de las partes vivas de las plantas, que las abejas recogen, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, las depositan, deshidratan, almacenan y dejan reposar en las colmenas para que madure (*Codex Alimentarius*, 2001).

La miel de las abejas sin aguijón tiene cierta variación en cuanto a las características de la miel de *Apis mellifera*, siendo esta menos dulce ya que probablemente, contiene una menor concentración de ciertos azúcares.

Es de consistencia más húmeda, por lo que es más propensa a fermentar en lapsos de tiempo cortos sino es almacenado en las condiciones óptimas debido a que la miel contiene una gran cantidad de azúcares la adjudica la propiedad de ser higroscópica por lo que si no se mantiene en condiciones de poca humedad adsorbe el agua presente en el ambiente agregándole una mayor cantidad de humedad a la miel lo que provoca que fermente con mayor facilidad.

Debido a la selectividad de estas abejas al momento del pecoreo de las flores, la cantidad de miel que producen es muy baja. Algunos autores tales como Collí (1993) reporta que los rendimientos por colonia varían de 250 a 500 ml; por otra parte, González (1990) y González y Cámara (1991) reportan que en otras partes del estado, la cantidad de miel obtenida ha sido alrededor de 1 y 1.250 kg por colmena (*Jobon*). Existen un gran número de factores que pueden afectar el volumen de producción de miel por número de colmenas los más relevantes son:

- La selectividad de estas especie de abeja
- La debilidad de la colmena
- La competencia del alimento con otras abejas (*Apis mellifera*)
- La distribución geográfica de la colmena
- Las dimensiones de las colmenas

La miel que produce las abejas sin aguijón así como las abejas *Melipona beecheii* es de baja viscosidad es decir es de consistencia ligera si se compara con la miel de las abejas *Apis mellifera* que presenta un mayor viscosidad y por ende mayor consistencia a la fluidez, su color varía desde el amarillo cristalino hasta llegar a ser semitransparente; el olor de la miel es similar al aroma del coco rancio que despiden las abejas, esto puede deberse a que al momento de la deshidratación de la miel las abejas impregnan su olor a la miel.

Durante mucho tiempo le han atribuido propiedades medicinales a las miel que produce los meliponinos (abejas sin aguijón), desde nuestros antepasados los mayas que utilizaban la miel de la abeja *Melipona beecheii* como fuente de alimento, como tributo a sus deidades, como medicina, hasta nuestros tiempos estos atributos adjudicamos siguen en marcha. Existen algunos autores que reportan el uso de la miel de meliponinos como medicina para tratar algunas enfermedades como la reducción y curación de cataratas ocular; combate bacterias que causan enfermedades como la tifoidea; tónico reconstituyente para mujeres gestantes (González- Acereto, 1988,1990, 1993).

Se dice que es eficaz en el tratamiento del *sudor de noche* que ataca con poca frecuencia a los niños (Caballero, *et al.* 1991) y se le ha dado uso para el tratamiento de catarata ocular, carnosidad en los ojos, conjuntivitis infecciosa y traumática, heridas y úlceras oculares, úlceras y llagas en la piel de difícil cicatrización, inflamación de las hemorroides, manchas del cutis (hepáticas, de gestación o solares), dientes flojos, laringitis, sinusitis y bronquitis (Medina, 1998),

En la Tabla 2 se mencionan algunos de las aplicaciones de la miel de meliponinos según Vit, *et al.* (2004).

Tabla 2. Aplicaciones de la miel de abejas sin aguijón

Especies	Uso medicinal
<i>Melipona beecheii</i>	Desordenes digestivos, cataratas en los ojos, infecciones respiratorias, curar heridas, recuperación después del parto, fatiga, alergias.
<i>Melipona favosa favosa</i>	Infecciones respiratorias.
<i>Melipona paraensis</i>	Recuperación después del parto.
<i>Melipona trinitatis</i>	Gastritis.
<i>Scaptotrigona mexicana</i>	Infecciones respiratorias.
<i>Nannotrigona perilampoides</i>	Tratamiento para cataratas, dolor de estómago, magulladuras.
<i>Plebeia jatiformis</i>	Cataratas en los ojos, dolor de cabeza, dolor de estómago.
<i>Trigona (Tetragonisca) angustula</i>	Desordenes estomacales, cataratas en los ojos, infecciones respiratorias, curar heridas.

(Vit *et al.*, 2004)

Vit y colaboradores, en el 2004, publicaron la composición Bioquímica de la miel de algunas especies de abejas sin aguijón, en la que señala la alta cantidad de monosacáridos, que constituyen el 60–80 % de la miel; agua, alrededor de un 15 a 20 %; minerales; sustancias nitrogenadas; ácidos orgánicos los cuales confieren a la miel un pH de 3.6 a 4.2; enzimas; vitaminas y hormonas, a las que se les atribuye actividad antibiótica.

2.4 Parámetros físicos y químicos presentes en la miel

La composición de la miel depende de principalmente, de la fuentes vegetativas del cual se deriva, especie de abeja, estado fisiológico de la colmena, estado de maduración de la miel, condiciones meteorológicas, época de cosecha, entre otros factores.

Los trabajos realizados por los autores Vit *et al.*, (2004) y Souza *et al.*, (2006) junto con otros colaboradores, se han enfocado a obtener información sobre las características de abejas nativas y de una manera u otra, a fomentar el establecimiento de normas que regulen la calidad de la miel de abejas nativas. En la Tabla 3 se mencionan algunas caracterizaciones fisicoquímicas de la miel de la abeja Melipona evaluadas por diferente autores.

Tabla 3. Comparación de análisis físicos y químicos de diferentes autores de la miel de abeja Melipona

Atributos	<i>M. beecheii</i> (Vit, 2004)	<i>M. beecheii</i> (Souza, 2006)	<i>M. beecheii</i> (Lira 2009)	Norma Mexicana (<i>A. mellifera</i>)
Acidez total expresada como miliequivalentes de ácido por kg	70.0	28.0	35.0	40.0
Humedad (% m/m)	30.0		23.2	20
Contenido aparente de azúcar reductor expresado como % (g/100g) de azúcar invertido	50.0	68.0	67.8	63.88
Hidroximetilfurfural (HMF), (mg/kg) de menos de 6 meses	40.0	64.0	18.0	40.0
Cenizas (% m/m)	0.50		0.2	0.60
Índice de formol		4.50	2.2	
pH			3.1	
Prolina			25.9	

2.4.1 Humedad

El contenido de agua influye decisivamente en la conservación de la miel. También interviene en el color, viscosidad, palatabilidad, sabor, peso específico, solubilidad y valor comercial, entre otros (Sancho *et al.*, 1991). Además condiciona la madurez y la granulación (Sancho *et al.*, 1991; Cox y Huser, 1996).

2.4.2 Azúcares reductores

Los azúcares representan entre 85 y 95 % de la materia seca de la miel y confieren a este producto numerosas propiedades físico-químicas, entre las que destacan el poder rotatorio, viscosidad, higroscopicidad y tendencia a la granulación (White, 1974; Sancho *et al.*, 1991). Las mieles son soluciones sobresaturadas de glucosa y fructosa en las que coexisten dos sistemas inestables, que, con más o menos facilidad, pueden provocar fenómenos de cristalización fraccionada, en las cuales intervienen en gran parte la glucosa, que es menos soluble que la fructosa (Sabatini *et al.*, 1990).

2.4.3 Hidroximetilfurfural (HMF)

Si se encuentra en proporciones más elevadas, origina sabores y olores extraños, así como alteraciones en color, indicando también el grado de envejecimiento de las mieles y las posibles adulteraciones que se hayan podido realizar en las mismas (Espada, 1982; Espada y Gómez, 1983; Pérez y Jimeno, 1990).

Este factor de calidad es un indicador de la frescura del sobrecalentamiento de la miel; es un compuesto que se forma principalmente por el desdoblamiento de la fructosa cuando este azúcar se encuentra en un medio ácido, acelerado el desdoblamiento cuando aumenta la temperatura (Oddo *et al.*, 1999).

HMF es claramente un índice de calentamiento, pero la afirmación de que la cantidad de HMF es independiente del tipo de miel y composición podría estar equivocado.

2.4.4 Cenizas

Los minerales que aparecen en ella provienen casi exclusivamente del arrastre que la planta hace de los minerales del suelo a través de la savia, de donde pasan al néctar presentando muchas diferencias en los rangos en que oscilan las cenizas, lo cual puede ser atribuido a él origen botánico (Trstenjak *et al.*, 1993; Sánchez y Pujola, 1996). El potasio es el mineral mayoritario en todas las mieles (Gómez, 1995). Se expresa en porcentaje en peso: máximo 0.60 %. Esta medida se relaciona con problemas de higiene (tierra y arena). La miel adulterada con melaza también puede presentar un alto porcentaje de cenizas.

2.4.5 pH

El pH determinada en la miel se refiere a los iones de hidrogeno presentes en solución y puede influenciar la formación de otros componentes, como la velocidad de producción de hidroximetilfurfural (Vidal y Fragosi, 1984).

2.4.6 Color

El color es una de las características de la miel que más influencia tiene tienen en la preferencia del consumidor. Este parámetro esta correlacionado con su origen floral, procesamiento, almacenamiento, factores climáticos durante la floración del néctar o la temperatura en la cual la miel madura en la colonia (Seemann y Neira, 1998; Campos, 1998). Los minerales influyen directamente en la coloración, estando presentes en mayor concentración en mieles oscuras en comparación.

2.4.7 Compuestos de volátiles

Los compuestos con propiedades aromáticas se encuentran presentes en las mieles en muy baja concentración, como mezclas complejas de componentes de relativamente bajo peso molecular y variada funcionalidad.

Por ello la caracterización de muestras de miel basada en el estudio de su fracción volátil, requiere el empleo de una técnica de separación de alta eficacia

como la cromatografía de gases capilar (GC). El acoplamiento de ésta a la espectrometría de masas (GC-MS), aporta una información cualitativa adicional a la retención cromatográfica y que permite, en la mayoría de las ocasiones, una identificación fiable. El análisis de volátiles en miel por GC o GC-MS requiere, sin embargo, la separación previa (fraccionamiento) de estos compuestos del agua y los carbohidratos, componentes mayoritarios de la matriz en estudio.

2.4.8 Microextracción en fase sólida (SPME)

Pawliszyn y colaboradores desarrollaron en los años 90 la técnica denominada microextracción en fase sólida (SPME), la cual puede considerarse una variante del análisis del vapor confinado, esta ha sido poco aplicada al estudio de volátiles en la miel.

El empleo de la técnica de extracción en fase sólida dinámica puede eliminar el uso de los disolventes completamente, pero requiere para la desorción térmica de los volátiles retenidos en la fase sólida, que los inyectores de los cromatógrafos de gases sufran modificaciones extensas o la adición de costosos módulos de desorción (Pawliszyn y Arthur, 1990). Por otro lado la microextracción en fase sólida (SPME) elimina los problemas asociados a la extracción en fase sólida dinámica mientras que mantiene sus ventajas; no requiere de disolventes y el tiempo de extracción puede ser reducido a algunos minutos (Pawliszyn y Arthur, 1990).

La metodología de esta técnica se basa en el principio de fraccionar los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra (Pawliszyn 1997).

Esta técnica consta de 2 etapas, la etapa de extracción y la etapa de desorción en la etapa de extracción se producen la migración de los analitos desde la muestra a la fibra hasta que se alcanza la situación de equilibrio. Este proceso de extracción se puede producir por adsorción a absorción en función del tipo de fibra utilizado. Para el proceso de extracción con SPME, se coloca un volumen de muestra en un vial herméticamente cerrado con un septum de silicona o teflón. Seguidamente

se perfora el septum y se introducen la jeringa en el vial. Exponiendo la fibra en la muestra por el tiempo ya establecido, cuando concluye este lapso de tiempo de extracción de los compuestos se retrae la fibra de la jeringuilla. En la etapa de desorción se liberan los analitos que fueron retenidos por la fibra al momento de la extracción.

2.5 Antioxidantes

Un antioxidante es una molécula que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo de otras moléculas (Halliwell, 2007). Para que un antioxidante (AH) tenga actividad antiradicalaria debe cumplir una característica básica que es generar un radical estable y menos dañino (RH) después de reaccionar con la especie radical ($R\bullet$) (Cos *et al.*, 2003). Esta reacción se basa en una transición redox, en la que el antioxidante cede un electrón o un átomo de hidrógeno a un radical libre (RL). Transformándose a su vez en un radical libre de naturaleza no toxica (A^*) y que en algunos casos puede ser regenerado por la acción de otros antioxidantes. De esta manera, los antioxidantes pueden detener reacciones de propagación e inhibir la oxidación de moléculas evitando la alteración en el funcionamiento normal de la célula.

2.5.1 DPPH

Este método se basa en la reducción del radical DPPH \bullet por los antioxidantes presentes en la muestra (Brand-Williams *et al.*, 1995). El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes. La decoloración del radical se determina a 515 nm y los tiempos de reacción son variables dependiendo de la naturaleza de los antioxidantes. En particular, las moléculas pequeñas con mejor accesibilidad al centro activo del radical poseen aparentemente una mayor actividad antioxidante por este método (Prior *et al.*, 2005).

El ensayo DPPH es un método rápido y sencillo que para su cuantificación solo requiere de un espectrofotómetro. A diferencia del ensayo TEAC, en este ensayo no es necesario preparar radical previamente, puesto que el DPPH se comercializa ya en la forma de radical y sencillamente requiere su disolución en el disolvente para el desarrollo del método. Por esta razón se trata de un método ampliamente utilizado para evaluación de la actividad antioxidante total. Es adecuado para medir la actividad antioxidante en alimentos, no obstante algunos antioxidantes pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al del DPPH (Prior *et al.*, 2005).

2.5.2 ABTS

Está basado en la captación por los antioxidantes del radical catión $ABTS^{\bullet+}$ generado en el medio de reacción. Este radical posee una coloración verde-azulada con un máximo de absorción a 415 nm y una serie máximos secundarios de absorción a 645, 660, 734, 815 y 820 nm (Sánchez-Moreno, 2002). Dependiendo de la variante del método TEAC utilizada se emplean distintas longitudes de onda, aunque las más frecuentes son 415 y 734 nm (Prior *et al.*, 2005). Para el desarrollo del método se suelen emplear dos estrategias; inhibición y decoloración. En la inhibición los antioxidantes se añaden previamente a la generación del radical $ABTS^{\bullet+}$ y lo que se determina es la inhibición de la formación del radical, que se traduce en un retraso en la aparición de la coloración verde-azulada. En la segunda, los antioxidantes se añaden una vez que el $ABTS^{\bullet+}$ se ha formado y se determina entonces la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical, es decir la decoloración de este radical (Sánchez-Moreno, 2002).

2.6 Actividad Antimicrobiana

Diversos componentes son los responsables de la actividad antimicrobiana de la miel, entre ellos están la osmolaridad, la acidez, el peróxido de hidrógeno, el origen botánico de la miel, entre otros (Molan, 1992). Sin embargo, un componente importante son los fitoquímicos, sustancias que provienen de la floración visitada por

la abeja para la colecta del néctar. Dentro de éste grupo están los flavonoides, que presentan propiedades antioxidantes y antimicrobianas y son reconocidos por inhibir un amplio rango de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Bogdanov, 1984). Se han realizado estudios comprobando la actividad antimicrobiana de las mieles, en especial para *A. mellifera* contra una diversidad significativa de patógenos (Molan, 1992, 2002; Demera *et al.*, 2003; Estrada, 2004). Sin embargo, en mieles de abejas sin aguijón, este tipo de investigaciones son escasos, no obstante, algunos estudios han demostrado su efectividad (Grajales *et al.*, 2003; Demera, 2003).

2.7 Microencapsulación

La Microencapsulación es un proceso físico-químico o mecánico para atrapar una sustancia en un material con el fin de producir partículas con diámetros de unos pocos nanómetros a unos pocos milímetros (Chen y Chen, 2007). La Microencapsulación de componentes bioactivos puede ser usada en muchas aplicaciones de la industria alimentaria, tales como controlar reacciones oxidativas, atrapar colorantes y saborizantes, garantizar el desprendimiento sostenido y controlado de sustancias, extender la vida de anaquel, entre otras. La microencapsulación de probióticos es usada para proteger las células contra un entorno adverso más que para un desprendimiento controlado (Champagne y Kailasapathy, 2008). La sustancia encapsulada es el núcleo, que es dispersada en una matriz denominada cápsula. Este material soporte debe ser de grado alimentario si va a ser usado en la industria alimentaria y debe ser capaz de formar una barrera para proteger a la sustancia encapsulada.

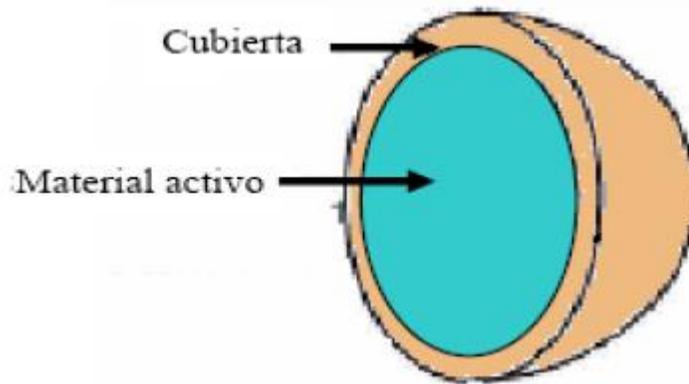


Figura 2. Representación de una microcapsula.

Existen diferentes tipos de encapsulados: tipo reservorio y tipo matriz (Figura 3). El tipo reservorio posee un cascarón alrededor del núcleo y es por esto que también es llamado cápsula. En el tipo matriz, el agente activo es dispersado sobre el material soporte y puede ser encontrado en la superficie. Una combinación de estos dos tipos genera un tercer tipo de cápsula, en el cual la matriz donde está el agente activo es recubierta por un cascarón (Zuidam y Shimoni, 2009).

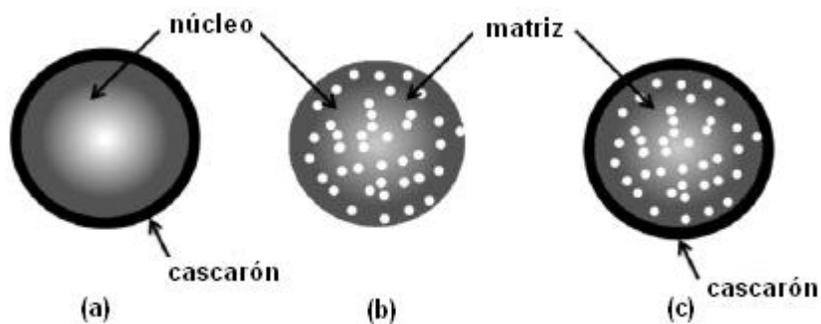


Figura 3. Representación esquemática de los sistemas de encapsulación. (a) Tipo reservorio, (b) tipo matriz, (c) tipo matriz recubierta.

2.7.1 Agentes utilizados para la Microencapsulación

El agente encapsulante es el material que recubrirá al compuesto de interés a la hora de realizar el secado por aspersion, si es para el uso alimentario el producto final, el recubriente debe ser un compuesto que se pueda ingerir sin que se tenga consecuencias.

2.7.1.1 Carbohidratos

Son extensivamente empleados en la encapsulación, se utiliza la técnica de secado por aspersion para ingredientes alimenticios como soporte de encapsulamiento, dentro de este amplio grupo se encuentran los almidones, maltodextrinas y gomas (Madene *et al.*, 2006; Murúa *et al.*, 2009).

2.7.1.2 Almidón

Almidones basados en ingredientes (almidones modificados, maltodextrinas, β -ciclodextrinas) son muy utilizados en la industria alimenticia (Madene *et al.*, 2006; Murúa *et al.*, 2009); dentro de los almidones más importantes se destacan el de papa, maíz, trigo, arroz, (Yañez *et al.*, 2002; Fuchs *et al.*, 2006; Loksuwan, 2007) e inulina (Sáenz *et al.*, 2009).

El almidón nativo y modificado de tapioca, y maltodextrina ha sido investigado por su habilidad de ser utilizado como material de pared para la encapsulación de β -caroteno. Tiene amplia distribución de tamaño, comparado con el almidón nativo y maltodextrina. (Loksuwan, 2007).

2.7.1.3 Gomas

Son generalmente insípidas, pero pueden tener un efecto pronunciado en el gusto y sabor de alimentos, son solubles, de baja viscosidad, poseen características de emulsificación y es muy versátil para la mayoría de los métodos de encapsulación (Madene *et al.*, 2006; Murúa *et al.*, 2009). Como ejemplos se tienen goma de

algarrobo, guar, goma de tamarindo, goma gelana y xantana (Morkhade y Joshi, 2007).

2.7.1.4 Maltodextrinas

La maltodextrina es un almidón hidrolizado que se prepara por calentamiento en presencia de ácidos (generalmente ácido clorhídrico) hasta conseguir la solubilidad y el color blanco deseado. Este tipo de dextrina es utilizada como agente emulsificante de aceites esenciales y como agente enturbiantes (Kuntz, 1997).

Se elaboran por métodos de hidrólisis ácida o enzimática de los almidones. En la selección de materiales de pared para encapsular, la maltodextrina es una buena solución entre el costo y la efectividad; tiene baja viscosidad a alta proporción de sólidos, son inodoras, incoloras y de baja viscosidad a altas concentraciones, además permiten la formación de polvos de libre flujo sin enmascarar el sabor original (García *et al.*, 2004), está disponible en diferentes pesos moleculares y son extensivamente utilizados en la industria de alimentos (Madene *et al.*, 2006; Sáenz *et al.*, 2009).

2.8 Técnicas de encapsulamiento

2.8.1 Extrusión

Técnica útil para producir saborizantes encapsulados duraderos y con una humedad óptima, que se emplea en la industria (Bhandari *et al.*, 2001; Bringas *et al.*, 2011b).

La Microencapsulación por extrusión involucra el paso de una emulsión del material activo y el material pared a través de un dado a alta presión. La extrusión constituye el segundo proceso más usado, después del secado por aspersion, para la encapsulación de sabores. Un proceso típico involucra la mezcla de sabores con jarabe de maíz o almidón modificado caliente, extruyendo la mezcla en forma de esferitas (pellets) dentro de un baño con un disolvente frío como el isopropanol. El

disolvente frío solidifica el jarabe en un sólido amorfo, bañando los sabores (Yañez *et al.*, 2002).

2.8.2 Secado por aspersión

El secado por aspersión es un proceso unitario útil para deshidratar alimentos líquidos y obtener productos en polvo con mayor vida de anaquel, fácil de manejar y transportar. No obstante, existe la posibilidad de que la temperatura del secado por aspersión empleada genere degradaciones de compuestos inestables al calor, lo que propiciaría la pérdida de propiedades sensoriales del alimento, como el aroma, el sabor y el color (González *et al.*, 2009). Para ayudar a evitar lo anterior, en el presente trabajo se aplicó la encapsulación, que consiste en envolver un material mediante una capa externa durante el secado por aspersión (Brazel, 1999). La capa externa de las micropartículas del alimento, comúnmente es conocida como pared viscoelástica, la cual es generada por el uso de encapsulantes y tiene como finalidad proteger los componentes del producto de posibles degradaciones químicas por el efecto de las temperaturas del proceso (Gibbs *et al.*, 1999).

En comparación con otros métodos, el secado por aspersión proporciona una eficiencia de encapsulación relativamente alta. La mayor eficiencia de encapsulación que se alcanza con el secado por aspersión, se encuentra entre 96 y 100%, valores superiores en comparación con otros métodos (López y Gómez, 2008). La figura 4 muestra el mecanismo de funcionamiento del equipo de secado por aspersión al momento de introducir la muestra de interés.

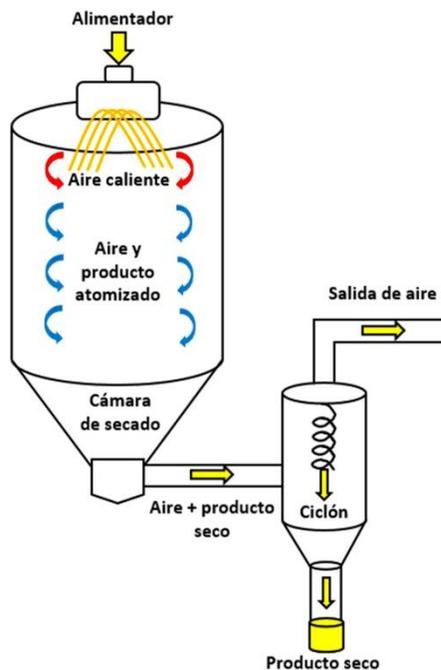


Figura 4. Esquema de funcionamiento del equipo de secado por aspersión.

2.8.2 Proceso de secado por aspersión

2.8.2.1 Matrices de encapsulación

Para la etapa inicial en el proceso de secado por aspersión se debe tener una buena mezcla del producto a encapsular, un soporte ideal que posea la propiedad óptimas emulsificante para poder formar una buena película.

Una emulsión consiste en un arreglo binario de dos fases fluidas inmiscibles, distribuidas de tal forma que la emulsión parece un sistema de una sola fase. Una fase es dispersada (fase dispersa) dentro de la otra (fase continua). Termodinámicamente el sistema es inestable, por lo que la fase dispersa se separará con el tiempo, que puede ser de pocos minutos a meses (Dumont, 2006).

Los soportes más comúnmente usados se dividen en cuatro clases: monosacáridos y disacáridos, almidones hidrolizados (maltodextrinas y sólidos del sirope de maíz), almidones químicamente modificados y gomas (principalmente goma arábiga) (Jafari *et al.*, 2008).

Los almidones químicamente modificados son almidones parcialmente hidrolizados y derivatizados para impartirles propiedades lipofílicas (emulsificadoras). El grupo lipofílico adicionado al polisacárido proviene de una reacción con algún anhídrido de un ácido di-carboxílico cíclico sustituido (Drusch y Schwarz, 2006). Estos almidones poseen excelentes propiedades emulsificantes y aportan una buena retención de compuestos volátiles durante el secado por atomización (Zasytkin y Porzio, 2004). Sin embargo, los almidones modificados tienen algunas desventajas: no son considerados “naturales” para propósitos de etiquetado; a menudo tienen un aroma extraño indeseable y no permiten buena protección a los saborizantes que se oxidan (Wandrey *et al.*, 2010).

2.9 Miel microencapsulada

La producción de miel en polvo, así como los polvos formados después del secado de jugos de frutas, puede ser destinado al consumo directo, se utiliza como un aditivo a una gama de productos alimenticios tales como yogures, bebidas, salsas, recubrimientos comestibles, así como suplementos dietéticos y preparados (Rodríguez -Hernandez *et al.*, 2005; Gabas *et al.*, 2007; Shrestha *et al.*, 2007; Hebbar *et al.*, 2008). Otras autores como Samborska y Czelejewska (2014) utilizan la goma arábica como agente de secado en la cual utilizo una proporción de sólidos miel: sólidos portadores, 1:1 y los polvos de miel que se obtuvieron presentaban buenas propiedades físicas: bajo contenido de agua y medio o buena fluidez.

Samborska y Bieńkowska (2013) caracterizaron las propiedades de las preparaciones de miel secado por aspersion producidos con el uso de maltodextrina y dextrina como aditivos de secado los productos obtenidos con dextrina tuvieron mayor higroscopicidad y solubilidad comparados con los polvos producidos con maltodextrina.

Takashi (1984) obtuvo miel en polvo con almidón céreo como un material de soporte o encapsulante a una temperatura de entrada entre 140 y 150 °C y una de salida 90-95 °C. El polvo resultante tenía una tendencia a fundirse cuando se expone

al aire, por lo tanto, se sugirió el uso de materiales de embalaje de alta barrera. Hebbar et al. (2002) implemento el desarrollo de un método mejorado para la producción de miel en polvo atreves del secado por aspersion del contenido de la miel resultante presento un sabor característico a miel y un color aceptable.

3. JUSTIFICACIÓN

La península de Yucatán es una de las zonas con la mayor actividad apícola de la república Mexicana, lo cual se traduce en una actividad de gran trascendencia e importancia social y económica, tanto para el estado de Yucatán como para los estados de Campeche y Quintana Roo. La Península produce miel de abejas europeas (*Apis mellifera*) así como miel de abejas nativas, tal como la miel de *Melipona beecheii*.

La miel de Melipona se ha considerado como un alimento funcional, agente medicinal (cultural) y un edulcorante, pero debido a su condición líquida su manejo no es fácil y su uso en formulaciones de algunos alimentos es restringido y debido a esta condición física sus propiedades con el tiempo de almacenamiento pueden variar, provocando su deterioro. Por tal motivo, se plantea desarrollar un procedimiento para obtener miel de melipona en polvo como una alternativa viable.

El presente trabajo de investigación se ha planteado con finalidad de generar información para buscar una solución a este problema, mediante la técnica de microencapsulación por secado por aspersion, para dar un valor agregado a esta miel conservando sus propiedades bioactivas y valores nutritivos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Determinar las condiciones óptimas para la obtención de un producto en polvo de miel de abeja *Melipona beecheii* por secado por aspersión.

4.2 Objetivos específicos

- Obtener miel polvo mediante deshidratación por aspersión a diferentes condiciones de temperatura del aire de entrada y de contenido de maltodextrina
- Determinar algunos parámetros físicos y químicos de la miel en polvo tales como rendimiento, contenido de humedad, retención de compuestos volátiles, densidad aparente, higroscopicidad, tiempo de solubilidad e hidroximetilfurfural (HMF).
- Determinar y validar las condiciones óptimas para la obtención de miel de abeja *Melipona beecheii* en polvo, a través del análisis estadístico de superficie de respuesta de los resultados obtenidos.
- Determinar la actividad antioxidante in vitro de la miel líquida y la miel en polvo.
- Determinar la actividad antimicrobiana de la miel líquida y en la miel en polvo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Estrategia de trabajo

El estudio consistió en optimizar las condiciones de un proceso de deshidratación mediante aspersion, considerando el rendimiento, humedad, retención de volátiles, tiempo de solubilidad, higroscopicidad, densidad aparente y HMF como criterios de la optimización, y en evaluar las principales propiedades y características de la miel en polvo que se obtuvo bajo las condiciones óptimas de deshidratación que se encontraron. En la figura 5 se plasma la estrategia general del trabajo.

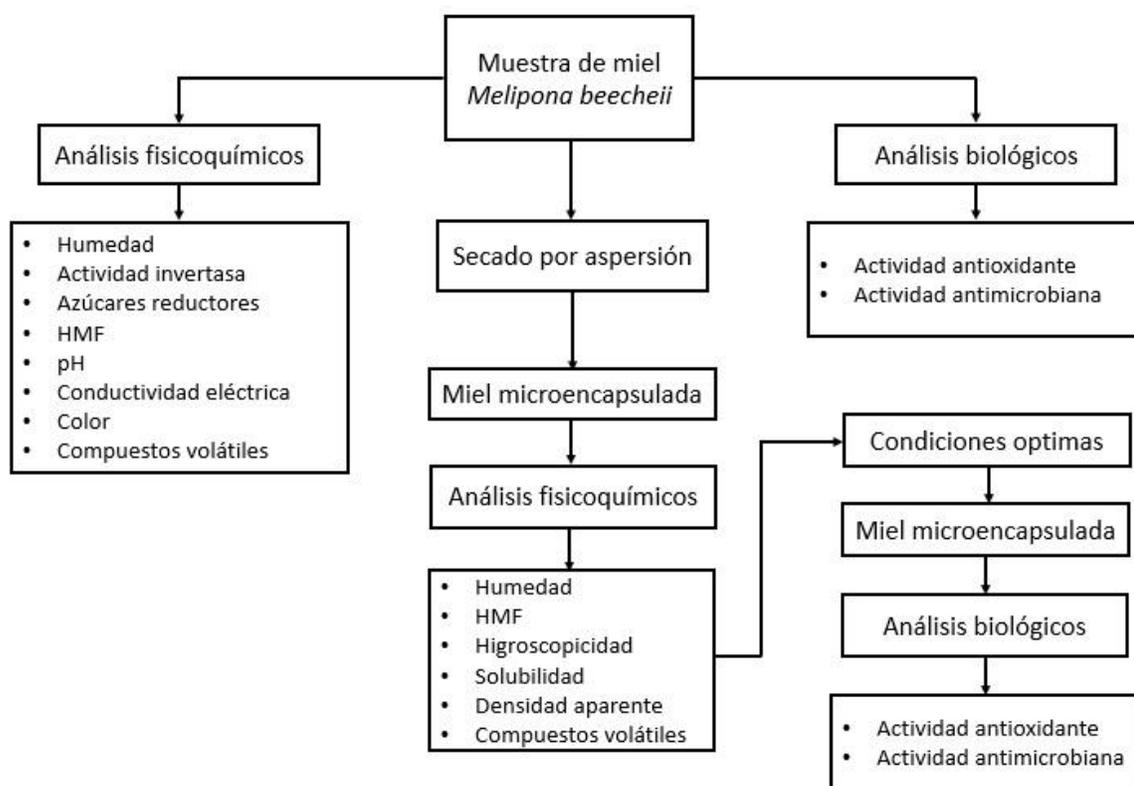


Figura 5. Diagrama de flujo de la estrategia general del trabajo.

Para la realización de este trabajo se emplearon muestras de miel procedentes de Calkiní municipio del estado de Campeche, todas las mieles fueron recolectadas de meliponarios identificados para asegurar la autenticidad y procedencia entomológica de la miel. Las muestras de miel fueron homogeneizadas y almacenadas a 6 °C en envases herméticamente cerrados hasta su posterior análisis.

A las muestras de miel de melipona se les realizó estudios físicos y químicos de, humedad, actividad de la enzima invertasa, conductividad eléctrica, azúcares reductores, HMF, color, pH y compuestos volátiles.

El proceso de secado por aspersion de la miel, se realizó utilizando una solución de miel con maltodextrina y agua, la cual se mantuvo en agitación constante con la ayuda de un agitador magnético, para asegurar la homogeneidad de la solución antes de ser pasado al equipo de secado para la obtención de los polvos.

Las variables de respuesta utilizados fueron rendimiento, humedad, retención de volátiles, tiempo de solubilidad, higroscopicidad, densidad aparente e hidroximetilfurfural HMF.

5.2 Análisis físicos y químicos de la miel de abeja *Melipona beecheii*

5.2.1 Humedad

Se determinó de acuerdo al procedimiento sugerido por la norma mexicana (NMX-F-036-1997 NORMEX) a través de la medición directa de sólidos solubles (índice de refracción) con un refractómetro digital con referencia a la tabla de Chataway.

5.2.2 Actividad invertasa

Se determinó de acuerdo al método propuesto por la Comisión Europea de la Miel (Bogdanov *et al.*, 2009), se usó 1 g de miel y 5 mL de buffer, este método emplea el uso de p-nitrofenilo- α -D-glucopiranosido la cual es usado como sustrato para la

determinación del número de sacarosa en la miel se divide en glucosa y p-nitrofenol por la acción de la α -glucosidasa (invertasa) que se encuentra en la miel. Una vez llevada a cabo la reacción, mediante el ajuste del valor de pH a 9.5, la reacción enzimática se detiene y al mismo tiempo el p-nitrofenol se transforma en el anión nitrofenolato, el cual corresponde a la cantidad de sustrato convertido y se determina fotométricamente a 400 nm.

5.2.3 Determinación de azúcares reductores

Se llevó a cabo esta determinación siguiendo el método sugerido por la norma APIDIOLOGIE (Bogdanov *et al*, 1997) y AOAC (2006), el cual es una modificación del procedimiento descrito por Lane y Eynon (Dierksmeier, 2005), que consiste en reducir la solución de Fehling titulando contra una solución de los azúcares reductores de la miel, utilizando azul de metileno como indicador interno.

5.2.4 Hidroximetilfurfural (HMF)

Se utilizó el método de la AOAC (2000), basado en el método de White (1979). Para ello se realizó un tratamiento de la muestra de miel (1 g) con los reactivos de Carrez y posterior lectura de la absorbancia a 284 y 336 nm, con un espectrofotómetro Cary 60 UV-VIS (Agilent Technologies, Malasia). Las determinaciones se realizaron por triplicado y se usó como blanco la muestra tratada con una disolución de bisulfito sódico que destruye la absorbancia debida al hidroximetilfurfural (Frías y Hardisson, 1992).

5.2.5 pH

Se llevó a cabo midiendo directamente el potencial de hidrógeno de la miel con un medidor del pH. Se tomó 10 g de muestra en 50 mL de agua destilada en un potenciómetro Hanna Instruments pH211 (Woonsocket, RI, EE.UU.) (AOAC, 2003).

5.2.6 °Brix

Los grados °Brix se midió utilizando un refractómetro digital calibrado.

5.2.7 Color

El color se determinó de acuerdo a la escala Pfund (Fell, 1978) utilizando un colorímetro Hanna Honey Color 221 (Woonsocket, Rhode Island, EE.UU.). Este equipo se calibró con glicerina y las lecturas de color fueron realizadas a 635 nm.

5.2.8 Determinación de los componentes volátiles

La determinación de los componentes volátiles en la miel y el polvo se realizó con el utilizó el método estandarizado por Cuevas (2007) por HS-SPME con una fibra DVB/CAR/PDMS. Para cada miel se utilizaron 6 g de miel en viales de 15 mL con 1.2 g de NaCl, 2.4 mL de agua destilada y agitación magnética. Los análisis se llevaron a cabo en un Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas. La extracción se hizo a 60 °C durante 40 min. Al finalizar el tiempo la fibra es retirada e insertada en el puerto de inyección del cromatógrafo. La desorción se hizo durante 4 min en modo splitless a 280 °C, con un inserto de 0.75 mm D.I. en el inyector. La separación de los compuestos volátiles fue realizada en una columna cromatográfica RTX-5 (Restek Corp., Norwalk, EE.UU.) de 30 m x 0.25 mm y 0.25 µm de espesor de fase estacionaria. El programa de temperaturas de la columna fue el siguiente: inicio a 50 °C durante 4 min, posteriormente se incrementó hasta 250 °C a una velocidad de 4 °C/min, manteniendo la temperatura final por 8 min.

5.3 Actividad antioxidante

5.3.1 ABTS

Se utilizó el método ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico)] de acuerdo al método de Re *et al.* (1999) y adaptado por Yang *et al.* (2009) en microplacas. Primeramente se preparó una solución del radical libre ABTS^{•+} (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) (7 µmoles) con persulfato de potasio (2.45 µmoles), se mezclaron ambos reactivos y dejaron reposar por 16 h en oscuridad. La absorbancia a 740 nm de la solución ABTS^{•+} se ajustó a 0.7 ± 0.02 , por dilución con etanol al 20 %. Para el análisis se prepararon diluciones de la miel con etanol al 20 % de 0 a 2.5

g/mL. Para cada dilución se colocaron en una microplaca 25 μ L de miel en cada pozo y 175 μ L de ABTS^{•+}. La absorbancia de cada muestra fue medida en un lector de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Se hizo una curva patrón del antioxidante Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico (Aldrich Chemical, St Louis MO, EE.UU.) con etanol al 20 %, en un intervalo de 0 a 0.35 mM. Los ensayos fueron realizados por triplicado y expresados como μ mol TE/ 100 g de miel.

5.3.2 DPPH

Se empleó el método descrito por Williams *et al.* (1995). Para la formación del radical libre DPPH[•] (Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) se preparó una solución al 0.1 mM con metanol, la cual se mantuvo en oscuridad total por 30 min hasta su estabilización. Para el análisis de la muestra se preparó una solución madre de 10 g/mL con metanol al 20 %. Se evaluaron diferentes concentraciones de la miel (0 a 4 g/mL). La capacidad de captación del radical DPPH[•] se determinó al agregar 25 μ L de miel en cada pozo de una microplaca y 175 μ L de DPPH[•]. La absorbancia de cada muestra fue medida a 540 nm en un lector de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Se realizó una curva con Trolox a diferentes concentraciones (0 a 0.2 mg/mL).

5.4 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de la miel se determinó a través de la técnica de difusión en disco descrita por Schwalbe *et al.* (2007). Empleando 5 cepas bacterianas (2 gram positivas y 3 gram negativas):

Gram positivas

- *Staphylococcus aureus* ATCC25923
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Gram negativas

- *Escherichia coli* ATCC 25922

- *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853
- *Vibrio choleare* ATCC

5.4.1 Metodología difusión en disco

Preparación de medio LB

Se diluyó 8.75 g de agar LB en 250 mL de agua destilada, se clarificó y esterilizó en un autoclave. El medio se vertió en cajas de Petri de 25 mL las cuales se guardaron a temperatura de refrigeración hasta su utilización.

Preparación de medio MH (Mueller Hinton)

Se diluyó 9.5 g de agar MH en 250 mL de agua destilada, se clarificó y esterilizó en un autoclave. El medio se vertió en cajas de Petri de 25 mL las cuales se guardaron a temperatura de refrigeración hasta su utilización.

Preparación del inóculo

Se seleccionaron de 3 a 5 colonias aisladas con la misma morfología de un mismo medio de cultivo. Con la ayuda de un asa de platino esterilizado se transfirieron las colonias a un tubo con 1.7 mL de solución salina para obtener una suspensión aproximada de 1×10^8 UCF, lo cual fue corroborado leyendo a 600 nm en un espectrofotómetro y tomando como blanco la solución salina. La cantidad de inóculo utilizada fue de 1×10^6 UFC por lo que se ajustó la solución tomando 990 μ L de solución salina y 10 μ L de la bacteria en un tubo de 1.7 mL nuevo y estéril.

Inoculación de las placas

Un vez realizado el ajuste de la turbidez del inóculo, con ayuda de un hisopo de algodón estéril se obtuvo de la suspensión (agitando bien para asegurar la impregnación de la bacteria en el algodón) una muestra, la cual se transfirió a una placa con agar Mueller Hinton deslizando el hisopo sobre la superficie. Este procedimiento se repitió rotando la placa dos o más veces. Las cubiertas de las placas se dejaron entreabiertas por un lapso de 3 a 5 min con la finalidad de que la humedad de la superficie desaparezca antes de colocar los discos. Se dispusieron

los discos sobre la superficie del agar seca y se presionaron levemente para fijarlos, una vez fijados los discos se procedió a dispersar sobre ellos las soluciones de miel (40 μ L) y antibiótico kamanicina (control, 20 μ L). Las placas se invertieron y depositaron en una incubadora a 37 °C por 12 horas, cuidando que el tiempo después de aplicados los discos no haya sido mayor a 15 minutos.

Lectura de las placas

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, cada placa fue examinada y medidos los diámetros de los halos de inhibición la placa Petri se mantuvo a una distancia de pocos centímetros sobre un fondo negro no reflejante.

5.5 Secado de la miel (Microencapsulación)

5.5.1 Preparación de la solución de miel

Con base a resultados de experimentos preliminares, la miel se mezcló con agua para evitar la obstrucción causada por la naturaleza altamente viscosa de la miel. Se le añadió maltodextrina 10 ED a tres concentraciones diferentes: 50%, 60% y 70%.

5.5.2 secado por aspersión

El secado de las soluciones de miel con maltodextrina se realizó en un equipo para investigación de secado por aspersión Lab-Plant SD-05 (Chelmsford, Essex, UK) utilizando una boquilla de aspersión de 0.5 mm de diámetro. Los parámetros utilizados para el funcionamiento del equipo fueron: temperatura de aire de entrada (110, 130 y 150 °C) y contenido de maltodextrina (50, 60 y 70 %). La temperatura de salida de los tratamientos en el equipo fluctuó de 75 a 80 °C. La preparación de la muestra se realizó mezclando 500 g de solución de miel para cada tratamiento (miel, agua y matodextrina). La alimentación al equipo de secado se realizó mediante una bomba peristáltica a un flujo de 0.52 L/h manteniendo la solución en agitación continua a una temperatura de 20 °C y utilizando un caudal de flujo de aire de 63 m³ /h. El flujo de entrada del aire de secado, flujo de alimentación y la temperatura de

alimentación se mantuvieron constantes a lo largo de los tratamientos realizados en los experimentos.

5.5.3 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental factorial (3^2) de tres niveles y dos factores: temperatura de entrada y contenido de maltodextrina. Se llevaron a cabo 12 tratamientos, las variables de respuesta fueron: rendimiento, humedad, retención de volátiles, densidad aparente, higroscopicidad, tiempo de solubilidad y HMF. El análisis de superficie de respuesta tuvo como objetivo final determinar las condiciones óptimas del proceso para obtener una miel en polvo de alta calidad, para lo cual, se empleó el software Design-Expert versión 8 (Statease Inc., Minneapolis, MN).

5.6 Análisis de miel microencapsulada

5.6.1 Humedad

Se determinó mediante desecación en una termobalanza. Las condiciones a utilizadas fueron: 1 g de la muestra en polvo, temperatura de 110 °C, durante 15 minutos en una balanza electrónico de humedad CRODE.

5.6.2 HMF

Se determinó de la misma forma que la miel líquida, reconstituyendo 1.9 g de miel microencapsulada y tomando 1 mL de agua.

5.6.3 Higroscopicidad

Se tomó 1 g de polvo de miel y se colocó en un desecador a 25 °C, con una solución saturada de NaCl (75,29 % RH). Pasado 48 h, la muestra se pesó y la higroscopicidad se calculó como la humedad adsorbida en 100 g de sólidos secos (g/100 g) (Tonon *et al.*, 2008).

5.6.4 Solubilidad

Se determinó a partir de 1 g de muestra de polvo con 25 mL de agua destilada a 25 °C. La mezcla se agitó en un vaso de precipitado de 50 mL con agitación magnética a 890 rpm y con una barra de agitación de 2 mm x 7 mm. El resultado se registró por el tiempo requerido para disolver completamente a la muestra (Goula *et al.*, 2010).

5.6.5 Densidad aparente

Se determinó usando un cilindro graduado mediante la determinación del volumen ocupado por 1 g de polvo utilizando una probeta de 10 mL (Goula *et al.*, 2010). Se calculó como el cociente entre el peso y el volumen, expresando el resultado en g/mL.

5.6.6 Determinación de los componentes volátiles

La determinación de los compuestos volátiles se realizó con las mismas condiciones utilizadas en la miel líquida. Empleando 3.75 g de miel, 3.5 mL de agua destilada y 0.5 g de NaCl, en viales de 15 mL con tapa rosca y membrana de silicona.

5.6.7 Actividad antioxidante

Se realizó mediante el método ABTS empleando la misma metodología de la miel líquida, se utilizando 1.75 g del polvo en 1 mL de agua, realizando una referencia.

5.6.8 Actividad antimicrobiana del polvo

La actividad antimicrobiana de la miel en polvo se determinó a través de la técnica de dilución en agar descrita por Boorn *et al.* (2010). Se emplearon 2 cepas bacterianas: La prueba se realizó con las dos cepas con las que se obtuvo mejor resultado de inhibición con la miel líquida.

Gram positiva

- *Staphylococcus aureus* ATCC25923

Gram negativa

- *Escherichia coli* ATCC 25922

Método dilución en agar

Preparación de medio MH enriquecido con miel en polvo de abeja sin aguijón

El medio de cultivo MH se preparó diluyendo 76 g de agar Mueller Hinton (DIFCO, USA) en 20 mL de agua destilada estéril. La solución se clarificó y esterilizó en un autoclave y seguidamente y antes de que gelifique, se añadió 3 g de miel en polvo de abeja sin aguijón para posteriormente trasvasarlo a cajas Petri de 10 mL, las cuales se guardaron a temperatura de refrigeración hasta su utilización.

Preparación del inóculo

Se tomaron muestras de los microorganismos en un ambiente estéril con un asa de platino esterilizado (2 a 3) de colonias aisladas crecidas en agar las cuales fueron transferidas a un tubo (1.7 mL) que contenía 1.0 mL de solución salina. La solución resultante contenía aproximadamente 1×10^8 UFC la cual se ajustó a 1×10^6 UFC mezclando 990 μ L de la solución salina con 10 μ L de la bacteria de interés.

Inoculación de las placas

Con la ayuda de una punta de micropipeta de 1 mL previamente esterilizada se realizaron perforaciones al medio de cultivo enriquecido con el agente antimicrobiano, por cada placa se realizaron dos pocillos (2mm aproximado), a los cuales se les agregó 20 μ L del inóculo.

Las cubiertas de las cajas de petri se dejaron entre abiertas por un lapso de 3 a 5 min para permitir que el medio de cultivo secase. Seguidamente las placas fueron cerradas, invertidas y colocadas en una incubadora a 37°C por 12 horas. Al término del tiempo de incubación se observaron las placas y midieron los halos de crecimiento de la bacteria.

6. RESULTADOS

6.1 Características de calidad físicas y químicas de la miel líquida de *Melipona beecheii*

En la Tabla 4 se presentan las características físicas y químicas estudiadas de la miel líquida de abeja *Melipona beecheii*. Debido a que no existe una norma sobre la calidad de la miel de abejas sin aguijón, estos resultados fueron comparados con los obtenidos por algunos autores que han investigado y reportado algunos parámetros físicos y químicos de miel de abejas sin aguijón. Así mismo se hizo la comparación con los parámetros físicos y químicos de la norma mexicana para abejas con aguijón *A. mellifera*. El contenido de humedad (25.6 %) fue mayor con respecto a la norma mexicana para mieles de *A. mellifera* pero similares a los reportados por Ibañez *et al.* (2008) (25.0 %) para la miel de abeja melipona de El Salvador y Lira, en el 2009, (23.2 %) para miel de abeja melipona de Yucatán.

Tabla 4. Valores obtenidos del análisis físico y químico de la miel líquida

Estadísticos	Humedad %	Actividad invertasa IU	Azúcares reductores %	HMF mg/kg	pH	Conductividad eléctrica mS/cm	Color mm pfund	Compuestos volátiles
Promedio	25.6	58.0	67.0	31.64	3.5	0.75	110 (Ámbar)	29

El contenido de azúcares reductores (67.0 %) fue muy similar al obtenido por Lira (2009) (67.8 %) e Ibañez *et al.* (2008) quien reportó una concentración de 75.63 % la cual probablemente se deba a que la miel proviene de un origen geográfico diferente por lo que es un poco mayor a la obtenida para *M. beecheii* de Yucatán.

El HMF presentó un resultado de 31.64 mg/kg, el cual es mayor al valor establecido por la norma mexicana de miel de *A. mellifera*. Lira (2009) reportó para

M. beecheii un valor de 18.0 el cual fue más bajo a lo obtenido y dentro de la norma mexicana para *A. mellifera*. El resultado obtenido probablemente se deba a la antigüedad de la miel, ya que estas colmenas fueron cosechadas después de dos años de permanecer intactas y se sabe que esta sustancia se produce por el calor y el tiempo.

Con respecto al pH, el valor obtenido (3.5) fue similar a los reportados por Fonte *et al.* (2013) para mieles de Cuba (3.6) y Lira (2009) para mieles de Yucatán (3.1).

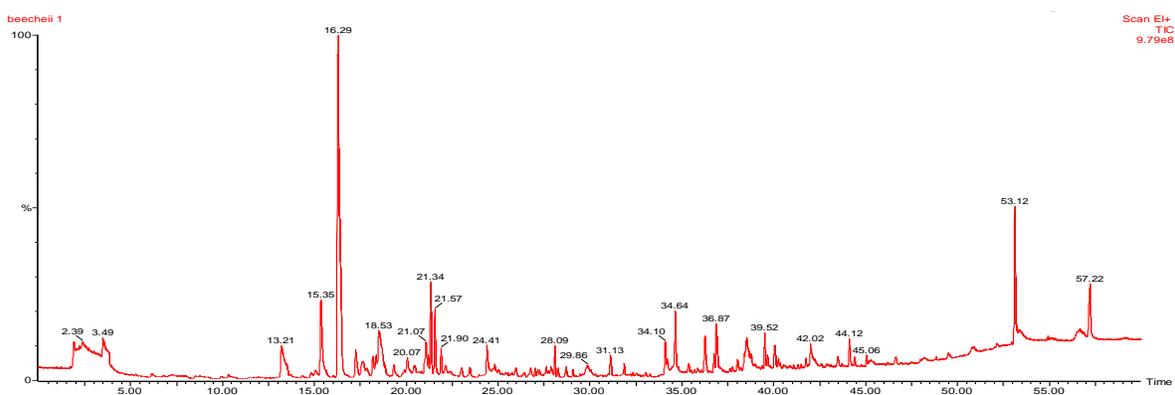
Ibañez *et al.* (2008) reportaron para conductividad eléctrica un valor de 0.00541 mS/cm el cual difirió con el obtenido en este estudio para la miel analizada (0.75 mS/cm). Este parámetro generalmente está relacionado con el contenido de minerales en la miel, el cual está directamente relacionado con el origen geográfico.

El color de la miel se midió a través de un colorímetro estandarizado para mieles del cual se obtuvo un valor de 110 mm en la escala Pfund, que corresponde a un color tipificado ámbar. Para las mieles de Matanza, Cuba, Fonte *et al.* (2013) reportaron un color ámbar extraclaro y por su lado Lira (2009), para la miel de Yucatán, un color ámbar claro.

Con el análisis cromatográfico del perfil de compuestos volátiles, se logró separar e identificar 29 compuestos (Tabla 5) presentes en la miel de abeja melipona. Lira (2009), reporto un total de 42 compuestos en mieles de *M. beecheii* de Yucatan. En la Figura 6 se presenta el cromatograma obtenido de este análisis en la miel de *M. beecheii*.

Tabla 5. Compuestos volátiles presentes en la miel de abeja *Melipona beecheii*

No.	COMPUESTO	IR
1	acetaldehído	528
2	ácido acético	645
3	tolueno	773
4	ácido isopentanoico	836
5	ácido 2-metilbutanoico	885
6	benzaldehído	960
7	mirceno	991
8	octanal	999
9	ácido hexanoico	1000
10	limoneno	1029
11	1,8-cineol	1031
12	fenilacetaldehído	1042
13	cis-óxido de linalol (Furanoide)	1073
14	isoterpinoleno	1088
15	nonanal	1101
16	isoforona	1121
17	fenilacetnitrilo	1142
18	4-oxo-isoforona	1145
19	1-Dodeceno	1190
20	acetato de 1-feniletilo	1194
21	hidrato de cis-sabineno	1221
22	<i>p</i> -anisaldehído	1250
23	acetato de trans-myrtanilo	1382
24	dodecanal	1409
25	hidroxitolueno butilado (BHT)	1516
26	ftalato de dietilo (plastificante)	1593
27	salicilato de hexilo	1675
28	salicilato de 2-etilhexilo	1807
29	1-Octadecanol	2078

Figura 6. Cromatograma representativo del perfil de volátiles de la miel de abeja *Melipona beecheii*.

6.2 Determinación de la actividad antimicrobiana mediante difusión en disco

La determinación de la actividad antimicrobiana por medio de la técnica de difusión en disco, solo fue posible con la miel líquida de abeja melipona, cuya acción inhibitoria logro detener en cierto grado el crecimiento de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* estudiadas (Figura 7).

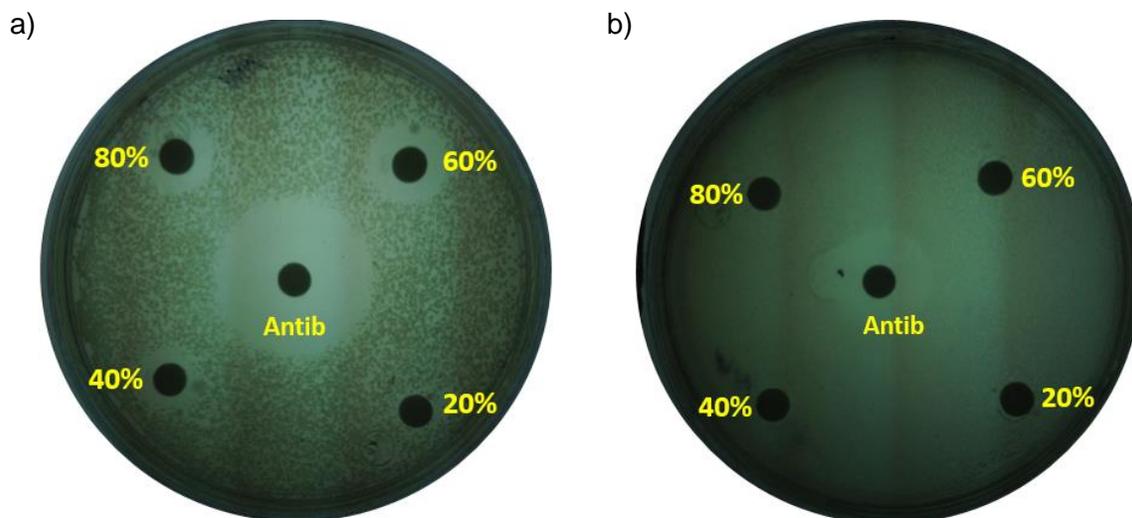


Figura 7. Actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, en donde el antibiótico es kanamicina y los distintos porcentajes de miel (a). Actividad antimicrobiana contra *E. faecalis*, en donde el antibiótico es kanamicina al igual que los distintos porcentajes de miel empleados (b).

Para *S. aureus* (Figura 7a) la acción inhibitoria de la miel comenzó con una concentración del 20 % con la cual se alcanzó el primer halo de inhibición y a medida que se aumentó el porcentaje de miel, aumentó en consecuencia el halo de inhibición del patógeno. Sin embargo, ninguna concentración de miel superó el efecto de inhibición (diámetro del halo) del control (kanamicina 10 mg). Por su parte, al experimentar con *E. faecalis* (Figura 7b) la actividad inhibitoria de la miel fue difícil de observar debido a que este microorganismo es traslucido aunque se pudo observar halos incipientes de inhibición. Sin embargo, estos halos no llegaron a superar el halo de inhibición del agente de control. De estas bacterias Gram positivas

estudiadas, la bacteria *Enterococcus faecalis* fue la que presentó mayor resistencia a la miel de melipona. Tal vez: la miel tuvo menor efecto en la bacteria *Enterococcus faecalis*.

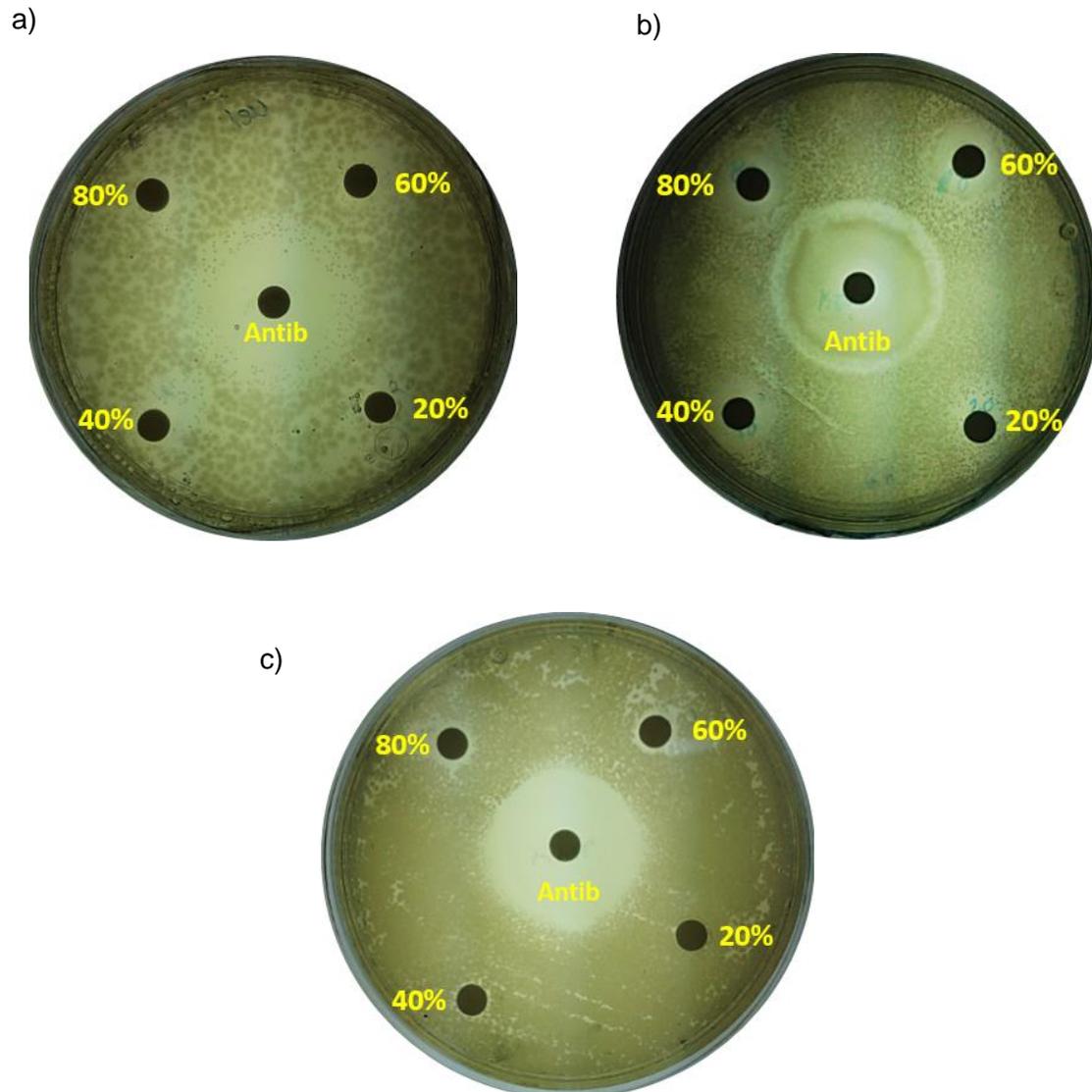


Figura 8. Actividad antimicrobiana contra tres bacterias Gram Negativas: *V. cholerae* (a), *P. aeruginosa* (b) y *E. coli* (c). El control utilizado fue kanamicina y se probaron distintos porcentajes de miel.

Con respecto a las bacterias Gram negativas estudiadas se observó una cierta inhibición en el crecimiento por efecto de la miel de melipona. Sin embargo, la bacteria *E. coli* (Figura 8c) solo mostró afectación a concentraciones arriba del 20 %.

La inhibición del crecimiento de los microorganismos, se observó a través de la formación de un halo alrededor del posillo de aplicación del antimicrobiano. La concentración más baja utilizada de la miel fue del 20% con la cual se apreció la aparición de un pequeño halo que fue en aumento a medida que la concentración de la miel se incrementó. Este comportamiento se observó con *V. Cholerae* (Figura 8a), *P. aeruginosa* (Figura 8b) la cual fue la que presentó mayor susceptibilidad a la miel y *E. coli* (Figura 8c) la más resistente. Al igual que con las bacterias Gram positivas, el porcentaje de miel utilizado en las bacterias Gram negativas tuvo un efecto menor que el antibiótico empleado como control (kanamicina, 10 mg).

En la Figura 9 se hace una comparación de los valores de los diámetros de inhibición de cada una de las cepas bacterianas evaluadas. Se denota la mayor inhibición en la cepa *Staphylococcus aureus* con un diámetro alcanzado de 1.5 cm la cual fue la más susceptible al efecto de la miel. Por su parte, *E. faecalis* fue la más resistente al efecto de la miel con el menor halo de inhibición medido de 0.7 cm. El control utilizado en las cepas formó un halo de inhibición mayor a los halos formados con todas las concentraciones de miel utilizadas, inclusive las más altas, no se experimentó con mayores concentraciones debido a la consistencia densa y viscosa de la miel.

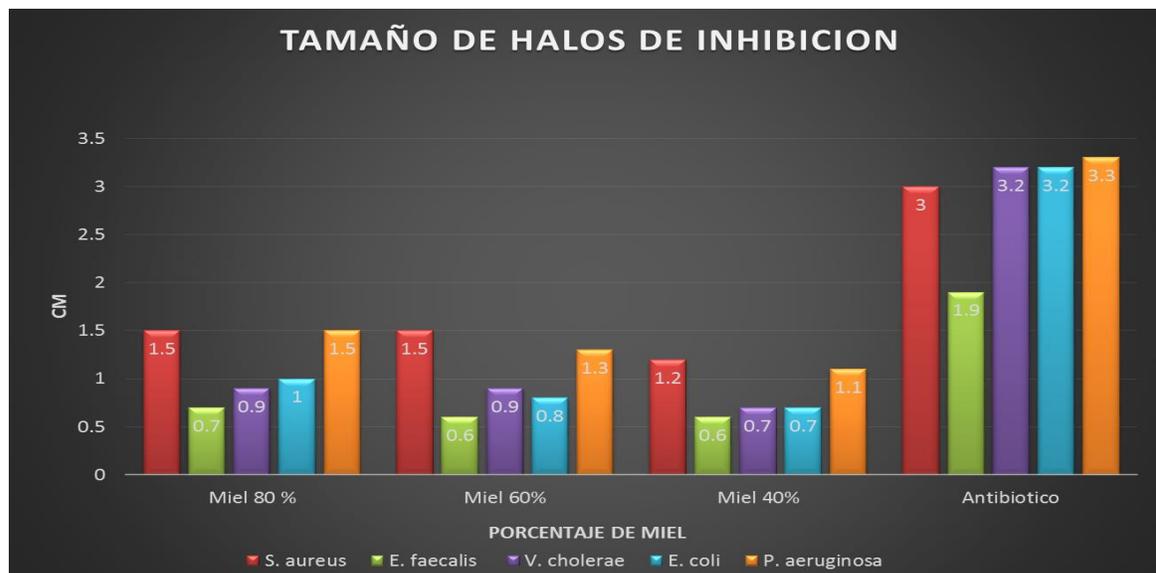


Figura 9. Comparación del tamaño los halos de inhibición de cada bacteria.

El efecto de la miel de abejas sin aguijón en la inhibición del crecimiento de algunas cepas de microorganismos patógenos ha sido reportado anteriormente. Ese es el caso de Dardón y Enríquez (2008) quienes reportaron que la miel de abeja *Melipona beecheii*, a un porcentaje de miel del 5%, posee actividad antimicrobiana frente a patógenos tales como *E. coli*, *P. aeruginosa*, y *S. Aureus*. Con la miel de *Scaptotrigona pectoralis* se requirió una concentración de 5% para inhibir el crecimiento de *E. coli* y de 2.5%.para inhibir *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

Chan-Rodríguez *et al.* (2012) reportaron actividad antimicrobiana de miel de abeja *Melipona beecheii* frente a patógenos como *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, pero no sobre *E. faecalis*, logrando halos de inhibición mayores con esta miel que con las mieles de *Apis mellifera*.

Por su parte Zamora *et al.* (2011), analizaron la actividad antimicrobiana de 30 muestras de miel diferentes concentraciones (100%, 75%, 50%, 25% y 12.5%) de abejas sin aguijón provenientes de diversas zonas geográficas de Costa Rica y observaron que la mayoría de las muestras ejercieron una actividad inhibitoria

cuando utilizaron miel pura (100%) sobre los patógenos *S. aureus* y *S. epidermidis*. A concentraciones del 25% se logró un efecto inhibitorio contra los patógenos *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*.

En otro estudio Gomes Tenorio *et al.* (2015), analizaron 17 muestras de miel de dos especies de abejas sin aguijón por medio del método de difusión en disco. Un total de 5 muestras fueron de la especie *Melipona subnitida* y 12 de la especie *Melipona fasciculata*. En los resultados se observó como las muestras de miel de *M. fasciculata* no ejercieron actividad antimicrobiana en ninguno de los patógenos evaluados (*S. aureus*, *E. coli* y *P. Aeruginosa*). Sin embargo, la miel de *M. subnitida* logró formar halos de inhibición bacteriostático en todos ellos, los diámetros observados para *S. aureus* fue de 29.3 a 32.6 mm, para *E. coli* de 12.0 a 27.3 mm y para *P. aeruginosa* de 14.3 a 21.3 mm, lo cual demuestra que la miel de las abejas sin aguijón tiene un importante efecto antimicrobiano.

6.3 Análisis de los polvos obtenidos de miel de abeja *Melipona beecheii*

En la Tabla 6 se muestran los resultados de las mieles en polvo de *M. beecheii* obtenidas a través del diseño experimental 3². Estos resultados se procesaron estadísticamente por medio del análisis de superficie de respuesta para determinar las condiciones óptimas del secado.

Tabla 6. Datos experimentales para el análisis de superficie de respuesta del efecto de las condiciones de procesamiento en la calidad de la miel en polvo de *M. beecheii*

Número del tratamiento	Temp. del aire de entrada °C	Maltodextrina %	Rendimiento %	Humedad %	Retención de volátiles %	Tiempo de solubilidades	Higroscopicidad g/100 g	Densidad aparente g/mL	HMF mg/kg
1	110	50	22.6	6.93	46	348	22.9	0.5311	52
2	110	60	25.2	6.30	52	444	20.0	0.5094	50
3	110	70	24.2	6.00	59	551	16.8	0.4580	56
4	130	50	25.2	6.06	55	279	23.1	0.5035	58
5	130	60	29.8	5.99	59	339	19.4	0.4770	46
6	130	70	34.2	5.67	68	358	19.6	0.4660	45
7	150	50	33.2	5.00	62	203	20.0	0.4570	69
8	150	60	39.6	4.95	70	228	19.8	0.4782	59
9	150	70	45.9	4.85	81	278	19.7	0.4412	53
10	130	60	29.3	6.0	61	347	19.6	0.4743	68
11	130	60	29.0	5.94	63	328	20.0	0.4697	61
12	130	60	29.5	5.87	63	338	19.7	0.4891	63

En la primera columna de la Tabla 6 se muestran las temperaturas del aire de entrada del equipo: 110, 130, 150 °C, estas temperaturas fueron de acuerdo con el porcentaje de maltodextrina utilizado: 50, 60, 70 %, respectivamente.

El rendimiento fue una de variables importantes que se consideraron para la optimización del proceso. Se pudo observar que el rendimiento del polvo de miel dependió directamente tanto de la temperatura como del contenido de maltodextrina.

El rendimiento fue en aumento con relación a la temperatura. El mayor rendimiento fue de 45.9 % a la temperatura de 150 °C y porcentaje de 70 % de maltodextrina.

La humedad de la miel en polvo obtenida varió desde 6.93 % hasta 4.85 %. La humedad varió en proporción inversa temperatura y el porcentaje de maltodextrina (MD) empleados. Los valores más bajos de humedad se obtuvieron a 150 °C y 70 % de maltodextrina.

Con respecto a la retención de volátiles se observó que a mayor temperatura de entrada de aire la retención de los compuestos volátiles fue mayor. A temperaturas bajas se observó una pérdida mayor, debido posiblemente al secado lento de las microcapsulas lo cual permitió la pérdida de compuestos volátiles. Las temperaturas altas permitieron secar con mayor rapidez las microcapsulas logrando así conservar un mayor número de compuestos volátiles.

El índice de solubilidad del producto aumentó en función del incremento de la relación de las concentraciones de maltodextrina y temperatura de entrada del aire caliente, con el tratamiento 7 se obtuvo un tiempo de solubilidad menor, de 203 segundos a una concentración de MD al 50 % y una temperatura de 150°C.

La higroscopicidad es una propiedad reológica importante de los productos en polvo debido a que a menor higroscopicidad se tendrá menor capacidad de absorción de humedad, lo cual permitirá conservar su forma la forma de polvo y extender su vida útil. La relación temperatura/MD de 110°C y 70% disminuyeron la higroscopicidad del producto de miel en polvo a 16.8 g/100 g.

Se observó que la densidad aparente aumentó ligeramente al incrementar la proporción de agente encapsulante (MD) y la temperatura. A 70% de MD y 150 °C se obtuvo un resultado de 0.4412 g/mL, lo cual es deseable para el envasado, ya que a mayor densidad aparente se requieren envases más pequeños para contener la misma cantidad.

Se sabe que la exposición prolongada de la miel a altas temperaturas provoca un aumento en el contenido de hidroximetilfurfural (HMF), lo cual es poco deseable en el producto final, por lo cual se consideró al HMF como una variable de respuesta importante en la optimización. Se observó que cuando se incrementó la relación Temperatura/Maltodextrina 150°C y 50%, el contenido del HMF aumentó (69 mg/kg de miel en polvo) al doble de HMF de la miel líquida.

Es importante considerar y recalcar que la miel utilizada en este estudio, de acuerdo a la experiencia y comentarios de los meliponicultores, estuvo almacenada en las colmenas por un espacio de dos años. Es muy probable que los valores elevados de HMF registrados se hayan debido esta causa. En una miel reciente (nueva) sin que haya estado expuesta a un proceso térmico, los resultados de este parámetro generalmente son bajos.

6.4 Análisis de superficie de respuesta

Para el proceso de optimización del secado se procedió asignar un criterio a cada parámetro del proceso (variable de respuesta) del secado (Tabla 7). El criterio asignado a cada una de las variables se hizo en función de las consideraciones mencionadas en la sección 4.3, las cuales se enuncian a continuación

Se consideró al rendimiento como máximo debido a que este refleja el porcentaje del material obtenido (microcápsulas) respecto a la cantidad de material (material activo más agente encapsulante) utilizado. Se trata de un parámetro económicamente importante debido al costo de los materiales.

La retención de volátiles es un aspecto importante considerado durante el proceso de secado debido a que su máxima retención le conferirá presencia y durabilidad al aroma y sabor característico del producto obtenido.

El contenido de humedad es uno de los principales indicadores de calidad, el cual se consideró mínimo ya que valores altos de humedad afectan la estabilidad y apariencia del producto (aglomeración) durante la vida de anaquel (Reineccius, 2004).

El tiempo de solubilidad es otro de los atributos de calidad de los productos en polvo. Se busca que la solubilidad del producto se realice en el menor tiempo y sin aglomeraciones para lograr una solubilidad casi instantánea.

Es necesario que la higroscopicidad sea la mínima posible para no afectar la vida de anaquel del producto ya que la capacidad de absorción de la humedad del medio ambiente podría causar el endurecimiento del producto o una consistencia viscosa.

La densidad aparente es importante para las operaciones de embalaje y transporte, este parámetro considera el volumen que ocupa el producto microencapsulado por lo que se debe mantener una máxima densidad para ocupar un volumen mínimo.

El contenido de hidroximetilfurfural (HMF) es uno de los principales indicadores de envejecimiento y calidad de los productos con alto contenido de azúcares. Este parámetro indica si un producto, como la miel, ha sido expuesto a altas temperaturas o ha estado almacenado largo tiempo. El proceso de secado por aspersión se realiza a través de un proceso térmico por lo cual el criterio considerado para esta variable de respuesta fue mínimo.

Tabla 7. Criterios asignados para cada variable de respuesta

VARIABLES	CRITERIOS
Temperatura	Máximo
Maltodextrina	En el rango
Rendimiento	Máximo
Retención de volátiles	Máximo
Humedad	Mínimo
Tiempo de solubilidad	Mínimo
Higroscopicidad	Mínimo
Densidad aparente	Maximo
HMF	Mínimo

Con los datos y criterios anteriores se llevó a cabo el análisis estadístico a través de un programa computacional estadístico (Design expert versión 8) con el que se obtuvo las condiciones óptimas para la obtención de los polvos y el gráfico optimizado de superficie de respuesta (Figura 10). Las mejores condiciones obtenidas en la optimización fueron: temperatura del aire de entrada, 150 °C; contenido de maltodextrina, 68%. A estas condiciones, el rendimiento fue 45%, el contenido de humedad 4.9%, la retención de volátiles 77%, el tiempo de solubilidad 255 s y el contenido de hidroximetilfurfural (HMF) 52 mg/kg.

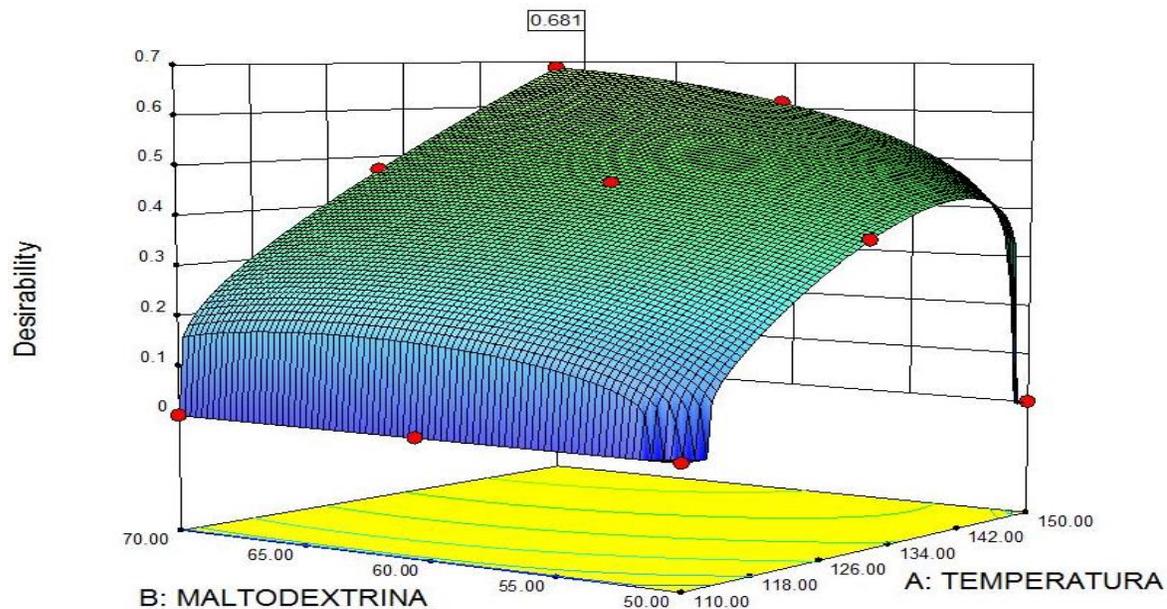


Figura 10. Gráfico de superficie de respuesta.

6.5 Microfotografía del polvo de miel de abeja melipona

El polvo de la miel de *M. beecheii* (Figura 11) obtenido con los parámetros optimizados, fue analizado por microscopía electrónica de barrido, se observó la predominancia y amplia distribución de partículas con formas uniformes (lisas con superficies intactas).

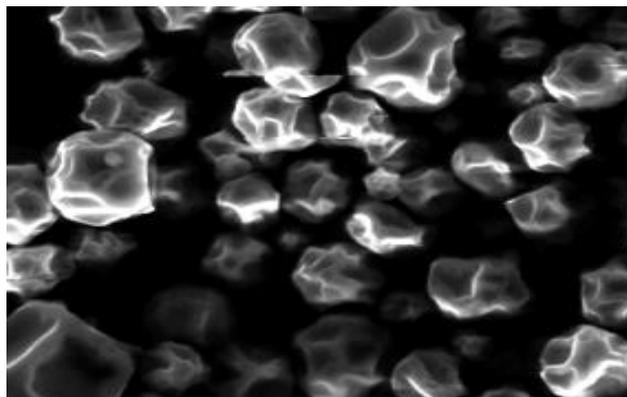


Figura 11. Microfotografía del polvo de miel de abeja melipona obtenido por secado por aspersión.

6.6 Determinación de la actividad antimicrobiana de la miel en polvo

La determinación de la actividad antimicrobiana de la miel en polvo se realizó por medio del método de dilución en agar. Se empleó una concentración de 3 g/mL de polvo de miel en medio de cultivo de agar (fue el límite máximo al cual se pudo diluir el polvo). Sin embargo, la dilución empleada fue insuficiente para inhibir el crecimiento de las dos bacterias empleadas: *Staphylococcus aureus* (Figura 12a) y *Escherichia coli* (Figura 12b).

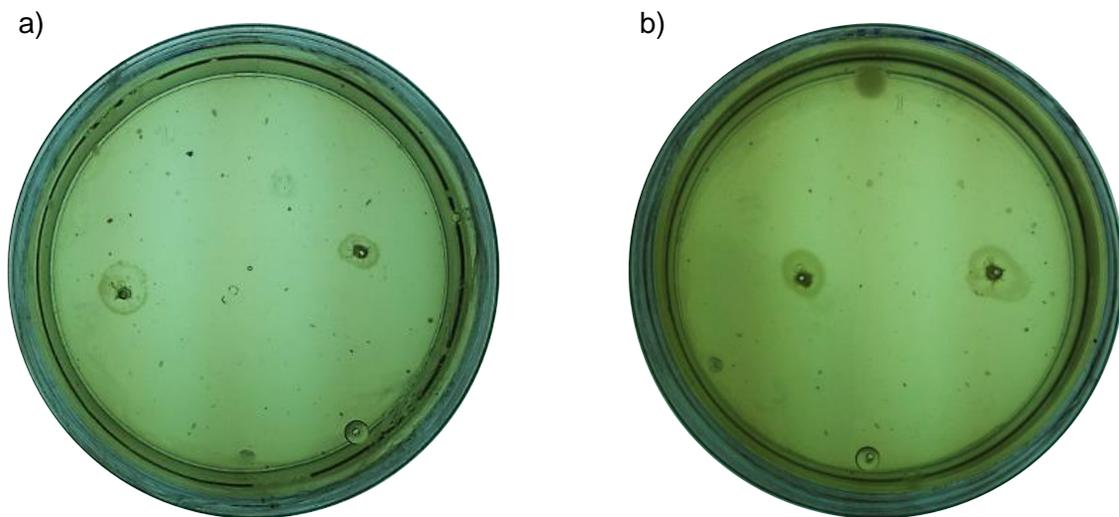


Figura 12. Comportamiento de *S. Aureus* (a) y *E. coli* (b) crecidas en agar enriquecido con miel en polvo.

En las Figuras 12a y 12b, se puede observar el desarrollo de las colonias de ambas bacterias. La nula inhibición se debió probablemente, además de la dilución, al tratamiento térmico al cual fue sometida la miel, ya que a temperaturas elevadas los componentes bioactivos se descomponen y pierden sus actividades biológicas.

6.7 Actividad antioxidante de la miel líquida y miel en polvo

Tabla 8. Actividad antioxidante de la miel de *M. beecheii*

	ABTS ($\mu\text{moles ET}/100\text{g}$)	DPPH ($\mu\text{moles ET}/100\text{g}$)
MIEL LIQUIDA	31.53 ± 0.4388	3.75 ± 0.0350
MIEL EN POLVO	38.79 ± 2.35	ND
REFERENCIA	32.51 ± 0.8503	ND

* ND = No determinado * Referencia = Miel, Maltodextrina y Agua

Se determinó la actividad antioxidante de muestras de miel líquida y miel en polvo con los métodos DPPH y ABTS. La actividad antioxidante de la miel líquida (Tabla 8) realizada con el método ABTS fue de 31.53 ± 0.4388 ($\mu\text{moles ET}/100\text{g}$ miel) y de 3.75 ± 0.0350 ($\mu\text{moles ET}/100\text{g}$ miel) con el método DPPH.

Se encontró que aunque es la misma muestra analizada para la determinación de la actividad antioxidante entre métodos empleados existe una diferencia, mostrando la mayor actividad obtenida con el método de ABTS.

Para el caso de la miel en polvo la actividad antioxidante fue de 38.79 ± 2.35 ($\mu\text{moles ET}/100\text{g}$ miel) con el método ABTS. Este resultado fue comparado con una referencia preparada con miel, maltodextrina y agua en proporciones similares a la contenida en el polvo, el valor obtenido fue de 32.51 ± 0.8503 ($\mu\text{moles ET}/100\text{g}$ miel). El resultado obtenido con la referencia aunque ligeramente menor fue similar al de la miel en polvo, al parecer el tratamiento térmico controlado produjo un ligero aumento de la actividad antioxidante del polvo, debido posiblemente a la acción de los compuestos formados por la reacción de Maillard en el calentamiento durante proceso de secado (Antony *et al.*, 2006).

Con el método DPPH no fue posible determinar la actividad antioxidante del polvo de miel ya que las microcapsulas no se diluyeron y ya que este es un método colorimétrico, la precipitación de los sólidos impidieron la lectura apropiada.

Se han realizado algunos trabajos de la actividad antioxidante con miel de abejas sin aguijón (Meliponas) tal como menciona Gutiérrez *et al.*, (2008), quienes determinaron la actividad antioxidante de 6 muestra de la miel de dos especies de abejas sin aguijón, 4 muestras de *Melipona beecheii* y 2 de *Melipona solani*. Las actividades halladas por estos fueron: 87.38 ± 12.92 ($\mu\text{moles ET}/100 \text{ g miel } M. \text{ beecheii}$) y 39.07 ± 10.52 ($\mu\text{moles ET}/100 \text{ g miel } M. \text{ solani}$), expresados en μmoles equivalentes a trolox en 100 g de miel.

Otros autores, como Vit *et al.*, (2012), determinaron la actividad antioxidante de 13 muestras de miel de abeja *Melipona favosa* procedentes de la Península de Paraguaná en Venezuela, dichos autores reportaron actividades antioxidantes que variaron de 45.91 a 227.92 ($\mu\text{moles ET}/100\text{g miel}$) con un promedio de 118.37 ± 50.67 ($\mu\text{moles ET}/100\text{g miel}$).

No se ha reportado un consenso con respecto a un valor de la actividad antioxidante de la miel de abeja sin aguijón, el cual depende en gran medida del origen floral, geográfico y entomológico de la miel. Los valores obtenidos en este trabajo estuvieron dentro del rango reportado. Otro factor que puede afectar este resultado es la manipulación (temperatura) y el almacenamiento (Beretta *et al.*, 2005; Saxena *et al.*, 2010).

Con el fin de encontrar la fuente que genera la actividad antioxidante de esta miel, se han reportado estudios del contenido de algunos constituyentes de la miel con posible potencial antioxidante, de los cuales se destacan los compuestos fenólicos. La cantidad y contenido de estos compuestos varían significativamente dependiendo del origen floral y geográfico de la miel (Gheldof *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2009).

Hay autores que reportan que el aumentar la temperatura de miel provoca que algunos parámetros físicos y químicos como el HMF aumenten o disminuya como la actividad de la diastasa (Codex Alimentarius, 2001). Pero también aumenta la actividad antioxidante de la miel (Turkmen *et al.*, 2006). Aunque no se ha logrado

identificar los compuestos que aumentan la bioactividad de la miel sometida a un calentamiento, estos se han asociado con productos de la reacción de Maillard (Antony *et al.*, 2006).

7. CONCLUSIONES

Los resultados de los análisis físicos y químicos realizados a la miel líquida de abeja sin aguijón *M. beecheii* fueron: humedad 25.6%, actividad invertasa 58.0 UI, azúcares reductores 67.0%, HMF 31.64 mg/kg, pH 3.5, conductividad eléctrica 0.75 mS/cm, color 110 mm pfund (Ámbar) y compuestos volátiles, 29.

La actividad antimicrobiana de la miel líquida de abeja melipona por medio de la técnica de difusión en disco mostró una efectividad de inhibición del crecimiento frente a los microorganismos evaluados a concentraciones de miel de 20% 40% 60% y 80%.

Los análisis reológicos de los polvos secos sirvieron para el análisis estadístico de superficie de respuesta, el cual permitió elucidar las condiciones óptimas del proceso de secado: temperatura del aire de entrada de 150 °C y contenido de maltodextrina de 68%. A estas condiciones, el rendimiento fue 45%, el contenido de humedad 4.9%, la retención de volátiles 77%, el tiempo de solubilidad 255 s y el contenido de hidroximetilfurfural (HMF) 52 mg/kg.

El análisis antimicrobiano de la miel en polvo por medio de la técnica de dilución en agar comprobó que la cantidad utilizada de miel en polvo no fue suficiente para inhibir el crecimiento de patógenos.

La actividad antioxidante de la miel líquida fue mayor con el método ABTS 31.53 ± 0.4388 ($\mu\text{moles ET}/100\text{g miel}$) que con el método DPPH 3.75 ± 0.0350 ($\mu\text{moles ET}/100\text{g miel}$).

La actividad antioxidante de la miel en polvo (38.79 ± 2.35 $\mu\text{moles ET}/100\text{g miel}$) fue mayor que la actividad de la miel líquida (31.53 ± 0.4388 $\mu\text{moles ET}/100\text{g miel}$).

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anónimo, (1984). Programa Conjunto FAO-OMS sobre normas alimentarias, Comisión de Codex Alimentarius/Norma Regional Europea Recomendada para la miel.

Antony S, Rieck JR, Acton JC, Han IY, Halpin EL, Dawson PL. (2006). Effect of dry honey on the shelf life of packaged turkey slices. *Poultry Sci*; 1811-20.

AOAC (2003). Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th ed., Vol. II, Horwitz, W. (Ed.), Gaithersburg, Maryland, EE.UU.

Ayala R. (1999) Revisión de las abejas sin aguijón de México (Himenóptera: Apidae: Meliponinae). *Folia Entomológica Mexicana*, (106):1-123.

Beretta G., Granata P., Ferrero M., Orioli M. (2005). Maf: standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal Chim Acta* 533:185–191.

Bogdanov, S. (2009). Harmonised Methods of the International Honey Commission: Introduction and General Comments on the Methods, Switzerland.

Boorn, K. L., Khor, Y. Y., Sweetman, E., Tan, F., Heard, T. A., & Hammer, K. A. (2010). Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. *Journal of applied microbiology*, vol. 108, no 5, p. 1534-1543.

Brand-Williams, W., Cuvelier, Me., Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol*, 28, 25-30.

Caballero L. Yam S.M. y Tec T.J.M. (1991). Prácticas Médicas mayas. Colección de letras mayas contemporáneas Vol. 12, INI-SEDESOL, México, DF pp.44-45

Carrillo M. F. (1998). Glosario de terminología Maya referente a la cría de abejas indígenas. En: revista Apitec No. 11, México DF, pp. 29-34

Carrillo M.F. (1993) Información no publicada. Resultados de evaluación de fichas de diagnóstico de meliponicultura en la región litoral del oeste de Yucatán

Champagne, C.P. and Kailasapathy, K. (2008). Encapsulation of probiotics. En: Garti, N. (Ed.), *Delivery and Controlled Release of Bioactives in Foods and Nutraceuticals*. Woodhead publishing Ltd., Cambridge, UK, pp. 344-369.

Chan-Rodríguez D, Ramón-Sierra J, Lope-Ayora J, Sauri-Duch E, Cuevas-Glory L, Ortiz-Vázquez E. (2012). Antibacterial Properties of Honey Produced by *Melipona beecheii* and *Apis mellifera* against Food born Microorganisms. *Food Sci. Biotechnol.* 21(3):905-909.

Chen, M.J. and Chen, K.N. (2007) Applications of probiotic encapsulation in dairy products. En: Lakkis, Jamileh M. (Ed.), *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*. Wiley-Blackwell, USA, pp. 83-107.

Codex Alimentarius Commission (2001). Revised Codex Standard for Honey. Codex Stan 12-1981, Rev. 1(1987), Rev. 2 (2001).

Codex Alimentarius. (2001). Codex standard 12 Revised Codex Standards for Honey. Standard and Standard methods. 11. (<http://www.codexalimentarius.IJ.gJ>).

Cos, P., Bruyne, T.D., Hermans, N., Apers, S., Berghe, D.V., and Vlietinck, A. J. (2003). Proanthocyanidins in Health Care: Current and New Trends. *Current Medicinal Chemistry*, 11, 1345-1359.

Cox, B. and Huser, B. (1996) Moisture level and color of honey, *Am. Bee J.* 136, 253-257.

Crane E. (1992) The past and present status of beekeeping with stingless bees. *Bee World.*; 73(1):29-42.

Dardón M. J y Enríquez E. (2008). Caracterización fisicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (meliponini) de Guatemala. Vol 33 N° 12.

Demera, J. and Angertv, E. (2003). Comparison of the activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* L. from different phytogeographic regions of Costa Rica. En memorias III Seminario Mesoamericano de abejas sin aguijón. Tapachula, Chiapas, México. 48-58 pp.

Drusch, S. and Schwarz, K. (2006). Microencapsulation properties of two different types of n-octenylsuccinate-derivatised starch. *Eur. Food Res. Technol.*, 222, 155-164.

Dumont, J.P. (2006). Emulsion-flavour interactions. In: Voilley, A. y Etievant, P. (eds.) *Flavour in Food*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd.

Echazarreta, C.M.; Quezada-Euan, J.J.G.; Medina, L. and Pasteur, K. (1997). Beekeeping in the Yucatán Peninsula, development and current status. *Bee World* 78(3): 115-127.

Espada, H.T. (1982). El Hidroximetilfurfural y el envejecimiento de la miel. *Vida Apícola*, 3: 15-16

Espada, H.T. y Gómez, A. (1983). Actividad bacteriostática, Hidroximetilfurfural, color, contenido de cenizas, y elementos minerales de las mieles de naranjo, romero y encina producida en Cataluña, País Vasco y Extremadura. XXIV Congreso internacional de Apicultura en Bucarest. Bucarest

Fell R.D. (1978). The color grading of honey, *Am. Bee J.* 18, 782-789.

Ferreira ICFR, Aires E., Barreira J.C.M., Estevinho L.M. (2009): Antioxidant activity of Portuguese honey samples: different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chem*, 114:1438–1443.

Frias, I.; Hardison, A. (1992). Estudio de los parametros analiticos de interes en la miel: humedad, acidez e indice de formol, hidroximetilfurfural e indice de diastasas. *Alimentaria*. (232), 71-74.

Gabas A.L., Telis V.R.N., Sobral P.J.A., Telis-Romero J., (2007) Effect of maltodextrin and arabic gum in water vapor sorption thermodynamic properties of vacuum dried pineapple pulp powder *J. Food Eng.*, 82, 246–252.

García, G., González M., Ochoa M. y Medrano H. (2004). Microencapsulación del jugo de cebada verde mediante secado por aspersion. *Revista Ciencia y Tecnología Alimentaria* 4(4): 262-266.

Gheldof N., Wang X-H and Engeseth, N. J. (2002). Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources. *Agric. Food Chem. SO*, 5870-5877.

Gomes Tenório E., Rocha de Jesús N., Ribeiro Nascimento A., Mara Teles A. (2015). Antimicrobial Activity of Honey of Stingless Bees, *Melipona fasciculata* and *Jandaira (Melipona subnitida)* Compared to the Strains of *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli* and *Pseudomonas Aeruginosa*. ICCMSE 2015.

González A. J. y Cámara G. V., (1991). Comparación entre la producción de miel entre colonias de *Melipona beecheii* Beenet alojadas en troncos ahuecados (jobones) y cajas modernas (P.N.N., PA-1 e INPA-1) a las cuales se suministró alimentación energética durante cuatro meses. Documentos especiales No. 3, Universidad de Riverside, SOSMAY, pp. 1-12

González A. J., (1990). Las colmenas racionales: un factor de cambio en la meliponicultura. *Revista Xanun*, Año 2 Núm. 8 pp. 2-7.

González-Acereto, J. A. (1984). Acerca de la Regionalización de la Nomenclatura Maya de las Abejas sin Aguijón (*Melipona sp.*) en Yucatán. En: *Revista de Geografía*

Agrícola, Análisis Regional de la agricultura. Universidad Autónoma de Chapingo. Núm. 5 y 6. Julio 1983 a Enero 1984. 190-193 pp.

Goula, M.; Adamopoulo, K. (2010). A new technique for spray drying orange juice concentrate. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11, 342-351.

Gutiérrez M. G., Enríquez E., Lusco L., Rodríguez-Malaver A., Persano O. L., Vit P. (2008). Characterization of *Melipona beecheii* and *Melipona solani* honey from Guatemala. *Rev Fac Farm*; 50 (1): 2-6.

Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35, 1147- 1150.

Hebbar H.U., Rastogi N.K., Subramanian R., (2008) Properties of dried and intermediate moisture honey products: A review. *Int. J. Food Prop.*, , 11, 804–819.

Hebbar U., Subramanian R., Jayaprakash N., Rastogi N.K. (2002), An improved process for the preparation of spray dried honey powder. Indian Patent No 1562/DEL/02.

http://www.livescience.com/animalworld/050613_mayan_bees.html

Ibáñez Salazar L. C., Alarcón Sorto R. C. (2008). Tesis: Determinación de las características fisicoquímicas de la miel producida por las especies de abejas sin aguijón: *Melipona beecheii* (*jicota*) y *Tetragonisca angustula* (*chumelo*) de meliponicultores de la zona norte del departamento de Chalatenango. Universidad de el Salvador: Facultad de Química y Farmacia. San Salvador, El Salvador, Centro América.

Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y. y Bhandari, B. (2008). Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Drying Technol.* , 26, 816-835.

Kuntz, L.A. (1997). Making the most of maltodextrins. *Food Product Design*, vol. 7, no. 5, p. 89-90, 94, 96, 99, 101-102, 104.

- Labougle J.M. y Zozaya J.A. (1986). La apicultura en México, Ciencia y Tecnología
- LiveScience, ed. (2005). Mayan Stingless Beekeeping in Danger. (En línea).s.l. Consultado 5 mayo 2006. Disponible en:
- Madene, A., Scher J., and Desobry S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release - a review. *International Journal of Food Science and Technology* 4(1):1-21, 2006.
- Medina C.M., (1998). Extracto Nutricional y Curativo de las abejas sin aguijón (meliponinos).en: *Revista Apitec* No 6, pp. 6-8
- Medina, M. y González A. J.(1995). meliponicultura en algunas regiones de México. Perspectiva hacia un cultivo racional. *Memorias del IX Seminario Americano de Apicultura*, colima, col. pp.: 46-50
- Michener C.D., (1974). The social behavior of the bees. Belknap Press Cambridge, Massachusetts, U.S.A
- Michener CD. (2000) The bees of the world. Baltimore, MD: John Hopkins University Press;. 913 p.
- Molan, P. (1992). The antibacterial activity of honey, I. The nature of antibacterial activity. *In* The antibacterial activity of honey. International Bee Research Association (IBRA). 5-28 pp.
- Morkhade, D. and Joshi S. (2007). Evaluation of gum damar as a novel microencapsulating material for ibuprofen and diltiazem hydrochloride. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 69(2):263-268.
- Murillo, M. R. M. (1981). Uso y manejo actual de las colonias de *Melipona Beecheii* Bennet (Apidae Meliponini) en el Estado de Tabasco, México. *Biótica*, 9(4): 423-428.

Murúa, B., C. Beristain and Martínez. F. (2009). Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering* 91(3): 380–386.

Murúa, B., C. Beristain and Martínez. F. (2009). Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering* 91(3): 380–386.

Oddo, P.L.; Piazza, M.G.; Pulcini, P. (1999). Invertase activity in Honey. *Apidologie* 30: 57-65

Pawliszyn, J. (1997). Solid-Phase Microextraction. *Theory and Practice*. New York: Wiley-VCH.

Pawliszyn, J. y Arthur, C. L. (1990). Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry* 62, 2145-2146.

Pérez, C.; Jimeno, M.F. (1990). Manejo y alteraciones de la miel. Diez temas sobre apicultura. Ed. M.A.P.A. VIII: 137-150

Pollonel, L.; Badertscher, R.; Butikofer, U.; Casey, M.; Dalla, T. M; Lavanchy, P. Meyer. J. Tabacchi, R. Bosset J.o. (2002) analytical methods for the discrimination of the geographic origin of elemental cheese. Main framework of the projects; chemical, biochemical, microbiological, colour and sensory analyses. *Eur. Food res. Technol.* 215,260-267

Prior R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.*, 53, 4290-4302

Quezada-Euan J.J.G. (2005). Biología y uso de las abejas sin aguijón de la Península de Yucatán, México (Hymenoptera: Meliponini). Tratados 16, Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. 112 pp.

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Riceevans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 26, 1231-1237.

Reineccius, G.A.(2004). The spray drying of food flavors. *Drying Technology*, vol. 22, no. 6, p. 1289-1324.

Rodriguez-Hernandez G.R., Gonzalez-Garcia R., Grajales-Lagunes A., Ruiz-Cabrera M.A., (2005) Spray drying of cactus pear juice (*Opuntia streptacantha*): Effect on the physicochemical properties of powder and reconstituted product. *Drying Technol.* 23, 955–973.

Roubik, D.W. (1989). *Ecology and Natural History of Tropical Bees*. New York, US, Cambridge University Press. 514 p.

Sabatini, A; Persano, O.L; Gioia, P.M; Accorti, M; Marcazzan, G. (1990). Glucide spectrum in the main Italian unifloral honeys Di- and Trisochoride. *Apicultura* 6 1990. p.63-70

Sáenz, C., Tapia S., Chávez J. and Robert P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry* 114(2): 616–622.

Samborska K., Bieńkowska B., (2013). Physicochemical properties of spray dried honey preparations, *Zesz. Probl. Postępow. Nauk Roln*, 575, 91–105.

Samborska K., Czelejewska M., (2014). The influence of thermal treatment and spray drying on the physico-chemical properties of Polish honeys. *J. Food Proc. Preserv.*38, 413–419.

Sánchez D.; Pujola, M. (1996). Mieles andaluzas, extremeñas y gallegas: composición mineral. *Vida apícola*, 78: 56-60

Sánchez-Moreno, C. (2002) Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Tech. Int.*, 8, 121-137.

Sancho, M; Muniategui, S; Huidobro, J; Simal, J. (1991). Mieles del país vasco. pH y tipos de acidez de bromatología XLIII-1 Santiago de Compostela (La Coruña), 77-86.

Saxena S., Gautam S., Sharma A. (2010). Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chem*, 118(2):391–397.

Schwalbe, R., Steele-Moore, L., & Goodwin, A. (2007). *Antimicrobial susceptibility protocols*. Crc Press.

Seemann, P.; Neira, M (1988). *Tecnología de la producción apícola*. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias Empaste. p 202

Shrestha A.K., Ua-arak T., Adhikari B.P., Howes T., Bhandari B.R., (2007). Glass transition behavior of spray dried orange juice powder measured by differential scanning calorimetry (DSC) and thermal mechanical compression test (TMCT). *Int. J. Food Prop.* 10, 661–673.

Souza, B.A.; Roubik, D.W.; Barth, O.M.; Heard, T.; Enríquez, E.; Carvalho, C.A.L.; Villas, J.B.; Marchini, L.; Locatelli, J.; Persano-Oddo, L.; Almeida, L.M.; Bogdanov, S.; Vit, P. (2006). Composition of stingless bee Honey: Setting quality standards. *INCI*. 31(12): 867-875

Takashi I. (1984). Preparation of powder of honey or honey containing liquid food. Japanese Patent No JP59085262.

Tec, P. J.; Bocara, M. (1980). Las abejas y la tierra Maya. *Boletín E.C.A.UD.Y*. Vol. 7 N° 42:2-30

Tonon, R.; Brabet, C.; Hubinger, M. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*. 88, 411-418.

Trstenjak, P. Z; Mandie, L. M; J; Grgie, Besic, J. (1993). Selenium levels in some species of honey in Easter Croatia. *Z Lebebsm Unters Forsch* 46-48

Turkmen N, Sari F, Poyrazoglu ES, Velioglu YS. (2006). Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chem*; 95 (4): 653-7.

Vit P., Mejías A, Rial L., Ruiz J., Peña S., González A. C., Rodríguez-Malaver A., Arráez M., Gutiérrez C., Zambrano A., Barth O. M. (2012). Conociendo la miel de *Melipona favosa* en la Península de Paraguaná, estado Falcón, Venezuela. *Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"*; 43 (1): 15-19.

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.

Wandrey, C., Bartkowiak, A. y Harding, S. E. (2010). Materials for Encapsulation. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Berlin: Springer Science+Business Media, LLC.

White Jr., J.W. (1974). Composición y propiedades de la miel. *La Apicultura en los Estados Unidos*. Ed. Limusa, 57-66

White, J. (1979). Methods for determining carbohydrates, hydroxymetilfurfural and proline in honey; collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 62 (3), 515-526.

Williams, W., Cuvelier, M; Berset, C.(1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 28 (1).

Yañez, J., Salazar J., Chaires L., Jimenez J., Marquez M. y Ramos E. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Revista Avance y Perspectiva* 21: 313-319.

Yañez-Ordóñez O, Trujano Ortega A, Llorente Bousquets J. (2008). Patrones de distribución de las especies de la tribu Meliponini (Hymenoptera: Apoidea: Apidae) en México. *INCI*; 33(1):41-45.

Zamora L. G., Arias M.L. (2011). Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón. *Rev Biomed* 2011; 22:59-66

Zasytkin, D. y Porzio, M. (2004). Glass encapsulation of flavours with chemically modified starch blends. *J. Microencapsulation* 21, 385-397.

Zuidam, N.J. y Shimoni, E. (2009). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to take them. En: Zuidam, N.J., Nedovic, V. (Eds.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer-Verlag, New York Inc., pp. 3-29.