

Artículo de Investigación Original

EFFECTOS ANTIOXIDANTES Y NEFROPROTECTORES DE LA MIEL EN RATAS DIABÉTICAS INDUCIDAS POR ALOXANO

RESUMEN

Antecedentes y Propósito: El estrés oxidativo juega un papel esencial en la instigación de complicaciones asociadas con la diabetes. El presente estudio evaluó los efectos antioxidantes y nefroprotectores de la miel contra el estrés oxidativo en ratas Wistar inducidas con aloxano.

Métodos: Treinta y seis (36) ratas macho Wistar que pesaban (210-250 g) se asignaron a seis (6) grupos de estudio con seis (6) animales cada uno (n=5). El grupo 1 se designó como control positivo y recibió agua destilada, el grupo 2 se designó como control negativo y recibió 120 mg/kg de peso corporal de aloxano, el grupo 3 se designó como inducido por diabetes y recibió 5 mg/kg de peso corporal de glibenclamida, los grupos 4, 5 y 6 fueron designados como grupos tratados y con diabetes inducida y recibieron (0,2 ml, 0,5 ml y 0,8 ml de miel) respectivamente. El tratamiento duró tres semanas (21 días), después de lo cual las ratas se sacrificaron por dislocación cervical bajo anestesia ligera con éter. Se recogió sangre para la evaluación bioquímica usando técnicas estándar (kits Randox).

Resultados: Los resultados revelan que las acciones de superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR) y catalasa (CAT) aumentaron significativamente ($p < 0,05$) en ratas diabéticas tratadas con miel. Las actividades de urea y creatinina en todos los grupos tratados revelaron una disminución significativa ($p < 0,05$) en comparación con el grupo de control negativo, mientras que la actividad de creatinina estuvo dentro del rango normal.

Conclusiones: Los resultados obtenidos de todos estos ensayos justifican la eficacia terapéutica de la miel para mejorar el estrés oxidativo en ratas diabéticas inducidas por aloxano y tiene potencial nefroprotector.

Palabras clave: Aloxano monohidrato, Diabetes; Glibenclamida, Miel, Estrés oxidativo.

1.0 INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es una de las enfermedades metabólicas más comunes, con más de 285 millones en 2010 y 438 millones en 2030 [1,2]. La universalidad de la diabetes puede determinarse genéticamente o desarrollarse a cualquier edad durante la vida de un individuo, y los estudios han demostrado que la diabetes es más frecuente en los países en desarrollo que en los países desarrollados [2]. Se sospecha que los cambios demográficos aumentan la incidencia y los factores de riesgo indeseables, como el sobrepeso (obesidad) y la vida sedentaria [3].

Comment [U1]: Mejor (lo cual recibieron)

Comment [U2]: Mejor (recolecto)

La diabetes mellitus es un mal funcionamiento metabólico con muchas etiologías factoriales y diversas [3]. El nivel alto de glucosa en la sangre es una característica de diagnóstico prominente de la diabetes, aunque varios otros síntomas incluyen fatiga inexplicable, aumento de la orina, aumento del hambre y la sed, pérdida de peso inesperada y visión borrosa. Los tipos de diabetes entre los humanos incluyen la diabetes tipo 1, lo que provoca que el sistema inmunitario luche contra la insulina y la domine, lo que lleva a la destrucción de la insulina [4]. Se cree que este tipo de diabetes está determinada genéticamente, y también algunos factores ambientales son esenciales en la enfermedad. El síntoma de este tipo de diabetes se nota temprano dentro de algunas semanas. El tipo más común de diabetes es el tipo 2, que puede surgir debido a numerosos factores; este tipo de enfermedad se presenta en varios tramos de edad, y por eso no siempre se notan los síntomas; muchas personas son diagnosticadas con diabetes sin síntomas específicos o poco comunes. La diabetes tipo 2 se atribuye principalmente al sobrepeso o en un estado de obesidad [3].

Las modalidades de tratamiento de flujo actual que utilizan quimio-fármacos como la metformina y la sulfonilurea disimulan la resistencia a múltiples fármacos y otros efectos secundarios, que incluyen; efectos gastrointestinales, acumulación de fluidos corporales y enfermedades del corazón [5]. Esto insta a la búsqueda de opciones alternativas que sean eficaces, seguras e inofensivas para reducir los niveles de azúcar y mejorar otras complicaciones diabéticas.

Los productos naturales se consideran una alternativa práctica [6], y recientemente la miel ha captado el interés de los investigadores como agente terapéutico alternativo [7]. La miel está compuesta por un mínimo de 181 sustancias y está constituida mayoritariamente por fructosa (38%) y glucosa (31%) como azúcares predominantes. Se ha informado que los flavonoides y la composición de ácido fenólico de la miel son responsables de forma independiente de las actividades antioxidantes y otras actividades medicinales de la miel [7]. Sin embargo, ha revivido el interés por estudiar las ventajas potenciales para la salud de la miel natural y sin procesar en el manejo de numerosos trastornos. Como resultado, se han descubierto varias propiedades médicas de la miel. Entre ellas se encuentran las acciones cardioprotectora [8], hepatoprotectora [9], hipoglucemiante [9] y antihipertensiva [10].

Se ha sugerido que el estrés oxidativo es la base del envejecimiento, la síntesis de mutágenos, la aterosclerosis, el cáncer y las enfermedades degenerativas [7]. Las células siempre crean un sistema de defensa contra los daños causados por el estrés oxidativo. Este sistema de defensa comprende captadores de radicales libres y otros agentes protectores oxidativos como superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa, tocoferol, ácido ascórbico y polifenoles [11]. Estos antioxidantes estimulan moléculas biológicas como lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y proteínas. Las células se desnaturalizan al desencadenar y provocar intensamente una respuesta antioxidante, y la miel muestra una fuerte acción antioxidante [7]. Por lo tanto, este estudio investiga los efectos antioxidantes y nefroprotectores de la miel en ratas diabéticas inducidas por aloxano.

2.0 MATERIALES Y MÉTODOS

La miel fresca se compró a Fibers Global Farms, Isuochi, en el área del gobierno local de Umunneochi del estado de Abia. Se evaluó en la Sociedad de Extensión de Apicultura, Umuahia, estado de Abia, para tener un contenido de humedad del 18,7%, lo que certifica que es miel pura y sin adulterar.

2.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Treinta y seis (36) ratas Wistar macho (210-250 g) adquiridas de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Agricultura Michael Okpara, Umudike, Estado de Abia, Nigeria, se utilizaron para este estudio. Los animales se aclimataron durante dos semanas y se mantuvieron en condiciones naturales, incluidas 12 h de luz y 12 h de oscuridad durante toda la investigación, con libre acceso a alimento granulado y agua ad libitum. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en seis grupos y se trataron de la siguiente manera:

Cuadro 1. Detalles de los Tratamientos

Groups	Descriptions	Treatments
1	Normal control rats	Normal saline and feed only
2	Negative control rats	Alloxan (120 mg/kg, i.p.)
3	Positive control rats	Alloxan (120 mg/kg, i.p.) + 5 mg/kg/day glibenclamide
4	Diabetic treated rats	Alloxan (120 mg/kg, i.p.) + 0.2 mL/kg/day honey
5	Diabetic treated rats	Alloxan (120 mg/kg, i.p.) + 0.5 mL/kg/day honey
6	Diabetic treated rats	Alloxan (120 mg/kg, i.p.) + 0.8 mL/kg/day honey

2.2 INDUCCIÓN DE LA DIABETES

Al final de la aclimatación, los animales de los grupos (2-6) se dejaron en ayunas durante 8 horas y luego se indujo la diabetes mediante inyección intraperitoneal (IP) de 120 mg/kg de peso corporal de solución de monohidrato de aloxano. Los animales con niveles de glucosa en sangre en ayunas superiores a 150 mg/dl se consideraron diabéticos después de 3 días de inducción y se seleccionaron para el estudio.

2.3 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE SERA

Las muestras de sangre se recolectaron mediante punción cardíaca al final del experimento, que duró tres semanas (21 días). Las muestras de sangre se almacenaron en tubos vacutainer limpios y se centrifugaron a 4000 g durante 15 minutos. El suero se utilizó para la estimación de marcadores bioquímicos como MDA, SOD, CAT, UREA y CREATINA utilizando kits de diagnóstico Randox.

2.4 DETERMINACIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

2.4.1 Determinación del nivel de malondialdehído (MDA)

La peroxidación lipídica se determinó espectrofotométricamente midiendo el nivel del producto de peroxidación lipídica, malondialdehído (MDA), según lo descrito por Onkawa et al. [12]. El malondialdehído reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar un complejo de color rojo o rosa que se absorbe al máximo en solución ácida a 532 nm.

2.4.2 Determinación de superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa se determinó utilizando el método Aebi [13]. Se disolvió adrenalina (10 mg) en 17 ml de agua destilada para preparar una solución de adrenalina. Se añadió muestra de suero (0,1 ml) a 2,5 ml de tampón de fosfato (pH 7,8). Se añadió solución de adrenalina (0,3 ml), se mezcló bien y se leyó la absorbancia a 450 nm con un intervalo de 30 segundos 5 veces.

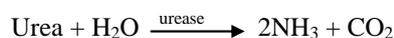
2.4.3 Determinación de la actividad catalasa (CAT)

La actividad de catalasa se determinó utilizando el método de Aebi [14].

Estimación del nivel de urea sérica

Esto se hizo siguiendo el método de Bauer et al. [15] método.

Principio: La urea en suero se hidrolizó a amoníaco en presencia de ureasa. A continuación, el NH₃ se mide fotométricamente mediante la reacción de Berthelot.



NH₃ + hipoclorito + fenol \square indofenol (compuesto azul)

Estimación de la creatinina sérica

Se empleó el método de Cockcroft y Gault [16] para la estimación de la creatinina sérica

Principio: a valores de pH alcalinos, la creatinina reacciona con el ácido pícrico para producir un compuesto coloreado, el picrato alcalino de creatinina, que se lee fotométricamente a 546 nm.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se expresaron como media \pm DE y se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con pruebas post hoc de comparación múltiple de Turquía para comparar el nivel de significación entre los grupos de prueba. Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Tabla 1: Efecto de la miel sobre los niveles de los parámetros antioxidantes.

Groups	Treatment	Glutathione ($\mu\text{g/L}$)	SOD (U/mg Prot.)	MDA (nmol/ml)	CAT (U/mg Prot.)
1	Normal Control (non-diabetic rats)	0.04 \pm 0.00	1.24 \pm 0.00	7.44 \pm 0.31	2.49 \pm 1.67
2	Diabetic non-treated	0.02 \pm 0.00	0.14 \pm 0.20	32.96 \pm 4.03	0.25 \pm 0.06
3	Positive-control diabetic treated with 500mg glibenclamide	0.04 \pm 0.01	1.19 \pm 0.01	6.24 \pm 0.85*	7.25 \pm 0.15*
4	Diabetic treated with 0.2ml/kg of Honey	0.03 \pm 0.02	2.12 \pm 0.13*	7.61 \pm 0.84*	4.25 \pm 0.58*
5	Diabetic treated with 0.5ml/kg of Honey	0.04 \pm 0.01	2.05 \pm 0.03*	8.03 \pm 0.42*	3.88 \pm 0.04
6	Diabetic treated with 0.8ml/kg of Honey	0.06 \pm 0.01*	2.15 \pm 0.02*	7.00 \pm 0.74*	2.22 \pm 0.01

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n=5). Los valores con un asterisco (*) aumentan significativamente ($p < 0,05$) en comparación con el control negativo. SOD: superóxido dismutasa, MDA: malondialdehído, CAT: catalasa.

El resultado del efecto de la miel sobre el glutatión, SOD, MDA y CAT de animales diabéticos, como se presenta en la Tabla 1, mostró que el glutatión se redujo significativamente ($P < 0,05$) en los animales de control diabéticos en comparación con los animales de control normales. La concentración de glutatión aumentó significativamente hasta volver a la normalidad en los grupos tratados con miel en comparación con los animales de control diabéticos. El agotamiento del glutatión también se revirtió en el grupo de Glibenclamida. El grupo de control diabético mostró un aumento significativo en la expresión de SOD y CAT en comparación con los animales normales. SOD y CAT también aumentaron significativamente en el grupo Honey a 0,2 ml, 0,5 ml y 0,8 ml en comparación con el control diabético y los animales normales. La expresión de MDA fue significativamente elevada en los animales de control diabéticos en comparación con los animales normales, y el tratamiento con miel pudo revertir significativamente la expresión de MDA a la normalidad.

Group	Treatment	UREA (mg/dL)	CREATININE (mg/dL)
1.	Normal Control (non-diabetic rats)	25.43± 5.69	0.96 ± 0.02
2.	Negative Control (diabetic non-treated)	97.86 ± 2.04	2.90 ± 0.03
3.	Positive Control (diabetic treated with 500mg Glibenclamide)	53.77± 5.12*	0.81 ± 0.40*
4.	Diabetic treated with) 0.2ml/kg of Honey	51.59± 0.82*	1.12± 0.04*
5.	Diabetic treated with 0.5ml/kg of Honey	54.96 ± 0.22*	1.14± 0.04*
6.	Diabetic treated with 0.8ml/kg of Honey	55.99 ± 1.31*	1.22 ± 0.02*

Tabla 2: Efecto de la miel sobre los niveles de los parámetros de la función renal

Los valores son Media ± DE: (n=5); los valores son estadísticamente significativos *p<0,05 cuando se comparan con el grupo de control negativo.

El efecto de la miel y la glibenclamida sobre la urea y la creatinina en animales diabéticos se presenta en la Tabla 2 anterior. Los animales diabéticos mostraron un aumento significativo (P < 0,05) en la concentración de creatinina en comparación con los animales normales. La miel en dosis de 0,2 ml, 0,5 ml y 0,8 ml y la glibenclamida redujeron significativamente (P < 0,05) los niveles de creatinina en comparación con los animales de control diabéticos. Los animales de control diabéticos mostraron una elevación significativa de urea en comparación con los animales normales, mientras que la miel y la glibenclamida redujeron significativamente los niveles de urea en comparación con los animales normales.

4.0 DISCUSIÓN

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico considerado un importante problema de salud y afecta a millones de personas en todo el mundo. Los diabéticos pueden tratarse con productos naturales, y recientemente la miel ha captado la atención de los investigadores como agente terapéutico alternativo. Este estudio se centró en los beneficios antioxidantes positivos de la miel y el efecto nefroprotector en ratas inducidas con aloxano.

Se ha demostrado que el aloxano causa hiperglucemia debido a la destrucción parcial o completa de las células beta. La creciente evidencia indica que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis de la diabetes mellitus, tanto en estudios experimentales como clínicos.

Comment [U3]: Mejor (en)

Comment [U4]: Elimina esta Palabra

La oxidación de la glucosa, la glucosilación no enzimática de las proteínas y la subsiguiente degradación oxidativa de las proteínas glicosiladas son responsables de la formación de radicales libres en la diabetes. Los niveles anormalmente altos de radicales libres y la pérdida de los mecanismos de defensa antioxidantes pueden dañar los orgánulos celulares y las enzimas, aumentar la peroxidación de lípidos y aumentar la resistencia a la insulina. Estos efectos del estrés oxidativo pueden aumentar el riesgo de complicaciones de la diabetes mellitus [17]. Este estudio investigó cómo se analizan los cambios en los biomarcadores del estrés oxidativo, como la superóxido dismutasa, la catalasa, los niveles de glutatión y la peroxidación lipídica (MDA).

Una de las características de la diabetes crónica es la peroxidación, y la producción de más radicales libres puede hacer que reaccionen con los ácidos grasos poliinsaturados. La peroxidación de Lípidos provocará la producción elevada de radicales libres. Nuestro resultado **mostró** una elevación significativa ($P < 0,05$) de MDA en los animales de control diabéticos ($32,96 \pm 4,03$) en comparación con los animales normales ($7,44 \pm 0,31$). La administración de miel en dosis de 0,2 ml, 0,5 ml y 0,8 ml pudo revertir significativamente la expresión de la MDA a la normalidad. El resultado de este estudio está en línea con los hallazgos de Akana et al. [18], que indicó un mayor nivel de MDA y una actividad reducida de la superóxido dismutasa en ratas diabéticas inducidas por aloxano.

Comment [U5]: Mejor (nuestros resultados)

Comment [U6]: Mejor (mostraron)

El resultado de la concentración de glutatión reveló una reducción significativa ($P < 0,05$) en los animales de control diabéticos en comparación con los animales de control normales. La concentración de glutatión aumentó significativamente hasta volver a la normalidad en los grupos tratados con miel en comparación con los animales de control diabéticos. El agotamiento del glutatión también se revirtió en el grupo de Glibenclamida. Estos resultados estaban de acuerdo con el informe de Erejuwa [19].

El anión superóxido se defiende mejor con la superóxido dismutasa (SOD), que convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno y agua. La sobreexpresión de SOD es perjudicial para las células, según algunos estudios.

La hemoproteína CAT logró la reducción de los peróxidos de hidrógeno y protegió los tejidos **de los radicales hidroxilo**. La disminución de la actividad de CAT podría resultar de la glicación de la enzima, y un aumento en la actividad de SOD podría proteger a CAT contra los efectos de los radicales superóxido [20]. La reducción de la concentración de creatinina después del tratamiento se puede atribuir a la capacidad de la miel para reducir la concentración de glucosa. La miel redujo significativamente ($P < 0,05$) el nivel de creatinina en comparación con el control negativo. Este resultado coincidió con los estudios previos de Obia [21]. Los resultados del presente estudio mostraron que la administración de miel podría ejercer un efecto antioxidante en ratas diabéticas inducidas por aloxano.

Comment [U7]: Mejor (del radical)

5.0 CONCLUSIÓN

Con base en el resultado obtenido de este estudio, se concluye que el mejor nivel de dosis de miel que produce el mejor resultado con una buena eficacia y menos enzimas

biomarcadoras de estrés oxidativo es de 0,8 ml. Por lo tanto, se recomienda sintetizar un fármaco antidiabético estándar si se purifica más.

APROBACIÓN ÉTICA

Todos los autores declaran por la presente que se siguieron los principios del cuidado de los animales de laboratorio (publicación NIH n.º 85-23, revisada en 1985), así como las leyes nacionales específicas cuando corresponda. Todos los experimentos han sido examinados y aprobados por el Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Agricultura Michael Okpara (MOUAAU).

Los resultados del estudio mostraron que la actividad de SOD fue menor en las ratas control diabéticas. La actividad de SOD puede atribuirse a la inactivación por H₂O₂ o la glucosilación de la enzima, lo cual está documentado en la diabetes. Las actividades de SOD aumentaron significativamente en el grupo Honey a 0,2 ml, 0,5 ml y 0,8 ml en comparación con el control diabético y los animales normales.

DESCARGO DE RESPONSABILIDAD DE INTERESES EN COMPETENCIA:

Los autores han declarado que no existen intereses contrapuestos. Los productos utilizados para esta investigación son productos de uso común y predominante en nuestra área de investigación y país. No existe absolutamente ningún conflicto de intereses entre los autores y los productores de los productos porque no tenemos la intención de utilizar estos productos como una vía para ningún litigio, sino para el avance del conocimiento. Además, la investigación no fue financiada por la empresa productora, sino que fue financiada por el esfuerzo personal de los autores.

REFERENCIAS

1. Alaebo PO, Njoku GC, Oriaku CE, Iloanusi DU, Ezech CJ, Ugboaja TC, James UA, Ekwunoh PO, Anyadike NN. Evaluación histológica y parámetros hematológicos de la miel en ratas albinas macho diabéticas inducidas por aloxano. *Internacional J. Bioquímica. Res. Rev.* 2022; 31(2): 17-26
2. Alaebo PO, Chukwu CN, Nwuke CP, Ukpabi-ugo JC, Ezeigwe OC, Ekwunoh PO. Efectos hipoglucémicos y hepatoprotectores del extracto crudo de hojas de Averrhoa Carambola en ratas diabéticas hembra inducidas por aloxano. *Noche Res. J. Chem. Ciencia*, 2020; 8(2):40-56.
3. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. "Estimaciones globales de la prevalencia de la diabetes para 2010 y 2030", *Diab. Res. Clin. Práctica*, 2010; 87(1): 4–14,
4. Kokil GR, Rewatkar PV, Verma A, Thareja S, Nakik SR. "Farmacología y química de la diabetes mellitus y los fármacos antidiabéticos: una revisión crítica", *Curr. Médico. Química*, 2010 17(35): 4405–4423

5. Castro JA, deMecca MM, Bartel LC. Efectos secundarios tóxicos de los medicamentos utilizados para tratar la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana), *Human Exp. Tóxicos* 2006; 25(8):471–479
6. David UI, George CN, Prisca CA, Isabel CN, Mildred CI, Chizurum PC. Efecto de la fórmula poli-herbal (PHF5) sobre los parámetros hepatoprotectores y bioquímicos de ratas Wistar diabéticas inducidas por aloxano. *Asiático J. Biochem. Gineta. Mol. Biol.* 2022; 10(3): 33-41. <https://doi.org/10.9734/ajbgmb/2022/v10i330247>
7. Ahmed S, Othman NH. La miel como potencial agente anticancerígeno natural: una revisión de sus mecanismos. *Medicina alternativa complementaria basada en la evidencia*, 2013; 82: 90-97
8. Rakha MK, Nabil ZI, Hussein AA. Efectos cardioactivos y vasoactivos de la miel silvestre natural contra el mal funcionamiento cardíaco inducido por la actividad hiperadrenérgica. *J. de Med. Alimento.* 2008; 11:91–8.
9. Alaebo PO, Onyeabo C, Oriaku CE, Njoku GC, Iloanusi DU, Ekwunoh PO. Efecto hepatoprotector y perfil lipídico de la miel en ratas diabéticas inducidas por aloxano. *Asiático J. Res. Bioquímica*, 2022; 10(1): 16-24. <https://doi.org/10.9734/ajrb/2022/v10i130212>
10. Al-Waili NS, Boni NS. La miel natural reduce las concentraciones de prostaglandinas en plasma en individuos normales. *Comida J Med.* 2003; 6:129–133.
11. Nagai T, Sakai M, Inoue R, Inoue H, Suzuki N. "Actividades antioxidantes de algunas mieles comerciales, jalea real y propóleo", *Food Chemistry*, 2001; 75(2): 237-240
12. Onkawa H, Ohishi N, Yagi K. Ensayo de peróxidos de lípidos en tejidos animales mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico. *Bioquímica Analítica*, 1979; 95: 351–358
13. Aebi H. Catalasa in vitro. *Métodos enzimol.* 1984; 105:121-6. [DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3]
14. Aebi HE. Catalasa. En: Bergmeyer, H.U., Ed., *Métodos de análisis enzimático*, Verlag Chemie, Weinheim, 1983; 273-286.
15. Bauer JH, Brooks CS, Burch RN. Estudios de función renal en hombres con insuficiencia renal avanzada. *América J. chico. Dis.* 1982; 2(1):30 – 35.
16. Cockcroft DW, Gault MH. Predicciones del aclaramiento de creatinina a partir de la creatinina sérica. *Nephron*, 1976; 16:31 – 41.
17. Ehiaghe FA. Algunos cambios fisicoquímicos asociados con la diabetes mellitus tipo 2 en la ciudad de Benin, Nigeria. *Intl J. Biol. Química ciencia*, 2015; 9(5): 2582 – 2588. [DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/jbcs.v9i5.27>]
18. Akana SF, Strack AM, Hanson ES, Horsley CJ, Mulligan ED, Bhatnagar S. et al. Interacciones entre el resfriado crónico, la corticosterona y la pubertad en la ingesta y el depósito de energía. *Estrés*, 1999; 3:131–146.

19. Erejuwa OO, Suleiman SA, Wahaba MS. Miel: un nuevo antioxidante, *Molecules*, 2012; 17(12):4400–4423.

20. Oportunidad B, Greenstein DS, Roughton RJW. El mecanismo de acción de la catalasa 1-análisis en estado estacionario. *Arco Biochem Biophys* 1952; 37: 301–339.

21. Obia OE, Odum JN, Chuemere A. Actividad nefroprotectora y antihiperlipidémica de la miel en ratas Wistar diabéticas inducidas por aloxano. *Internacional J. Bioquímica. Res. Y revisión*, 2018; 22(1), 1-7. <https://doi.org/10.9734/IJBCRR/2018/41585>