



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LA MIEL DE AGUACATE PARA  
REDUCIR *IN VITRO* BIOPELÍCULAS BACTERIANAS EN CEPAS  
DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* COMO  
POSIBLE ALTERNATIVA EN EL TRATAMIENTO DE HERIDAS DE  
INTERÉS VETERINARIO

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el Título de Médico Veterinario Zootecnista

Profesor Guía

José Miguel Álvarez Suárez

Autora

Melissa Alejandra Díaz Rojas

Año

2018

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, "Estudio de la capacidad de la miel de aguacate para reducir *in vitro* biopelículas bacterianas en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* como posible alternativa en el tratamiento de heridas de interés veterinario", a través de reuniones periódicas con el estudiante Melissa Alejandra Díaz Rojas, en el décimo semestre, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Dr. José M. Álvarez Suárez PhD  
Médico Veterinario Zootecnista  
CC. 1756653372

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, "Estudio de la capacidad de la miel de aguacate para reducir *in vitro* biopelículas bacterianas en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* como posible alternativa en el tratamiento de heridas de interés veterinario", de Melissa Alejandra Díaz Rojas, en el décimo semestre, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Dr. Juan José Pesántez Valdivieso  
Médico Veterinario Zootecnista  
CC. 1716395791

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

---

Melissa Alejandra Díaz Rojas

C.I.: 1722698212

## **AGRADECIMIENTOS**

Un agradecimiento especial a mi tutor, el Dr. José M. Álvarez Suárez, por su dedicación, generosidad y paciencia, y por proporcionarme las herramientas para desarrollar esta investigación. A mi corrector, el Dr. Juan José Pesántez, por su ayuda y tiempo para pulir este estudio. Al personal docente de la Universidad de las Américas, por compartir su conocimiento para mi formación profesional, con un especial reconocimiento al Dr. Santiago Prado por abrirme las puertas para continuar aprendiendo diariamente y compartir sus conocimientos conmigo. A la Dra. Paola Torres, por sus enseñanzas y su aporte constante en mi aprendizaje. A mis padres Sonia y Santiago, y mis hermanas Gabi y Dani, por su apoyo incondicional en el cumplimiento de mis metas, su motivación y guía que me han enseñado a sortear los obstáculos mas difíciles, y por siempre apoyarme en las decisiones que tomo. A Rita, por ser un modelo a seguir de disciplina y exigencia.

A mis amigas: Hillary, Alejandra, Estefanía, Stephany y Sophia, que fueron parte de este proyecto desinteresadamente, gracias por los años de amistad, por sus oportunos consejos y por estar siempre para mi; las quiero con todo mi corazón.

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis en la memoria de Maxi, a Robin, Charlotte, "Patucho" y Oss, y cada animal que ha dejado una huella en mi vida, que son la inspiración y motivación de mi esfuerzo diario y la razón por la que escogí esta carrera.

## RESUMEN

Desde la antigüedad, la miel se ha utilizado en la medicina tradicional por sus propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, curativas y terapéuticas, siendo utilizada en la clínica de especies menores como colaboradora en la curación de diferentes heridas. Este estudio fue diseñado utilizando una miel monofloral de la región andina de Ecuador, miel de aguacate (*Persea americana*), para determinar sus parámetros fisicoquímicos e investigar su capacidad para inhibir y reducir *in vitro* el desarrollo de biopelículas bacterianas en una bacteria gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y gram negativa (*Klebsiella pneumoniae*). El análisis fisicoquímico reveló que los valores estaban dentro de los estándares internacionales propuestos para las mieles tropicales, salvo la conductividad eléctrica (mS/cm) y el contenido de cenizas (%) que presentaron rangos más altos, los cuales son característicos para este tipo de miel. La actividad antimicrobiana de la miel también se determinó mediante el análisis del contenido de peróxido de hidrógeno y su capacidad para inhibir la formación de biopelículas, así como para eliminar las biopelículas preformadas. Los valores de peróxido de hidrógeno en la miel de aguacate fueron mucho mayores que aquellos reportados previamente en la literatura para mieles de otras regiones y origen floral. Asimismo, se demostró una alta capacidad para inhibir la formación de biopelículas, así como eliminar biopelículas preformadas en *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*. Después de analizar los resultados, se concluyó que la miel de aguacate posee propiedades antibacterianas capaces de eliminar la biopelícula preformada de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*, así como una mayor capacidad para inhibir la formación *in vitro* de biopelículas bacterianas.

**Palabras clave:** miel de aguacate, biopelícula, peróxido de hidrógeno

## ABSTRACT

Since ancient times, honey has been used in traditional medicine for its anti-inflammatory, antibacterial, healing and therapeutic properties, being used in small animal practice as a collaborator in the healing of different types of wounds. This study was designed using a monofloral honey from the Andean region of Ecuador, avocado honey (*Persea americana*) to determine its physicochemical parameters and to investigate its ability to inhibit and reduce *in vitro* the development of bacterial biofilms in a gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus*) and gram negative (*Klebsiella pneumoniae*). Physicochemical analysis revealed that the values were within the international standards proposed for tropical honeys, except the electrical conductivity (mS/cm) and the ash content (%) that were out of these ranges, which are characteristic for this honey type. The antimicrobial activity of honey was also determined by analyzing the hydrogen peroxide content and its ability to inhibit the formation of biofilms as well as to eliminate preformed biofilms. The values of hydrogen peroxide in avocado honey were higher than those previously reported in literature for honeys from other geographical and floral origin. Likewise, a high capacity to inhibit the formation of biofilms was demonstrated, as well as the elimination of preformed biofilms in *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. After analyzing the results, it was concluded that avocado honey possesses antibacterial properties capable to remove the preformed biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*, as well as a greater capacity to inhibit the *in vitro* formation of bacterial biofilms.

**Keywords:** avocado honey, biofilm, hydrogen peroxide



## INDICE DEL CONTENIDO

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. ANTECEDENTES .....	1
1.2. OBJETIVOS .....	2
1.2.1. Objetivo General.....	2
1.2.2. Objetivos Específicos .....	2
1.3. POBLACIÓN Y MUESTRA .....	3
1.4. HIPÓTESIS .....	3
2. CAPÍTULO II. MARCO REFERENCIAL .....	4
2.1. MIEL DE ABEJA .....	4
2.1.1. Generalidades .....	4
2.2. Tipos de miel .....	5
2.2.1. Origen floral.....	5
2.3. Propiedades de la miel .....	6
2.3.1. Composición química de la miel .....	6
2.3.2. Propiedades físicas de la miel de abeja .....	7
2.3.3. Propiedades biológicas .....	8
2.3.3.1. Miel de flor de aguacate ( <i>Persea americana</i> ).....	10
2.4. Usos de la miel .....	10
2.4.1. En Medicina y cicatrización .....	10
2.4.1.1. Propiedades Bactericidas de la Miel.....	11
2.4.1.1.1. Actividad peróxida y no peróxida .....	12
2.4.1.1.2. Papel de los flavonoides como antibacterianos .....	12
2.4.1.2. Propiedades antiinflamatorias de la Miel .....	13
2.4.1.2.1. Papel de la miel en la prevención y curación de la inflamación .....	13
2.4.1.3. Propiedades antioxidantes de la Miel .....	14
2.5. BIOPELÍCULAS .....	14
2.5.1. Formación de la biopelícula bacteriana.....	15
2.5.2. Infecciones bacterianas por biopelículas.....	16

2.5.2.1. Mecanismos de resistencia.....	17
2.5.3. Evidencias que relacionan el biofilm con enfermedades en animales .....	17
<b>2.6. MICROORGANISMOS PATÓGENOS .....</b>	<b>18</b>
2.6.1. Género <i>Staphylococcus</i> .....	18
2.6.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
2.6.2. Género <i>Klebsiella</i> .....	19
2.6.2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	20
<b>3. CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1. Ubicación geográfica .....	22
3.2. Materiales .....	22
3.2.1. Materiales de laboratorio .....	22
3.2.2. Equipos.....	23
3.2.3. Sustancias o Reactivos .....	23
3.2.4. Material biológico .....	24
3.3. Metodología .....	24
3.3.1. Muestras de miel .....	24
3.3.2. Contenido de polen .....	26
3.3.3. Análisis fisicoquímico .....	27
3.3.3.1. Determinación de color en miel .....	27
3.3.3.2. Análisis de acidez y pH en miel .....	27
3.3.3.3. Determinación de la conductividad eléctrica .....	27
3.3.3.4. Determinación de la actividad de la enzima diastasa en miel .....	28
3.3.3.5. Determinación del contenido de Hidroximetilfurfural (HMF) ...	28
3.3.3.6. Determinación del contenido de humedad .....	29
3.3.3.7. Determinación del porcentaje de cenizas .....	29
3.3.4. Actividad antimicrobiana.....	30
3.3.4.1. Contenido de peróxido de hidrógeno en las muestras de miel .....	30
3.3.5. Determinación de la capacidad de la miel para inhibir la formación de biopelículas y eliminar la biopelícula preformada .....	31
3.3.6. Estadística .....	32

4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	33
4.1. Análisis fisicoquímico.....	33
4.1.1. Análisis de color en miel.....	33
4.1.2. Acidez y pH en miel.....	34
4.1.3. Conductividad eléctrica y porcentaje de cenizas.....	34
4.1.4. Hidroximetilfurfural (HMF) y el índice de diastasa.....	35
4.1.5. Contenido de humedad .....	35
4.2. Capacidad antibacteriana .....	36
4.2.1. Efecto de la miel para inhibir la formación de la biopelícula y eliminar la biopelícula preformada en <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	36
5. CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	41
5.1. Conclusiones .....	41
5.2. Recomendaciones .....	42
REFERENCIAS .....	44
ANEXOS .....	52

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Conversión de néctar en las abejas de miel.....	5
Figura 2. Etapas de formación del biofilm. ....	16
Figura 3. Grandes colonias viscosas mucoides de <i>Klebsiella pneumoniae</i> cultivadas en agar sangre.....	21
Figura 4. Mapa de la procedencia de la miel de Aguacate (Prov. Pichicha- Quito (Tumbaco, Chillogallo, Amaguaña y Pintag), Cayambe (Cangahua) y Mejía (Machachi)).....	26
Figura 5. LAURACEAE. <i>Persea americana</i> .....	26
Figura 6. Formación de la biopelícula.....	32
Figura 7. Contenido total de peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) en la muestra de miel de aguacate. ....	37
Figura 8. Esquema de reacción de oxidación de la glucosa catalizada por la enzima glucosa oxidasa. ....	38
Figura 9. La miel de aguacate al 20% en comparación a la solución de miel artificial al 20%. ....	39
Figura 10. Eficiencia de la miel de aguacate para eliminar la biopelícula comparada con la solución al 20% de miel artificial. ....	39

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la abeja melífera.....	4
Tabla 2. Composición química de la miel. ....	7
Tabla 3. Principales compuestos polifenólicos de la miel.....	9
Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos en miel de aguacate del Ecuador. ....	33

## 1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. ANTECEDENTES

Actualmente el uso indiscriminado de antibióticos ha provocado que la medicina moderna afronte un nuevo desafío por querer combatir agentes patógenos causantes de infecciones, debido a su resistencia a los antimicrobianos. Frente a esta problemática, es necesario buscar alternativas terapéuticas que ayuden a combatir a estos patógenos sin continuar favoreciendo a los fenómenos de bioresistencia, y a la vez, se busca proponer una alternativa más natural, siendo la miel de abeja una opción que está siendo aceptada por su gama de propiedades.

La miel y sus productos se han utilizado desde la antigüedad como alimento y medicina para curar muchas enfermedades; esta práctica se llama apiterapia (El-Aidy et al., 2015). La importancia medicinal de la miel se ha documentado en las bibliografías médicas más antiguas del mundo, y desde la antigüedad se conoce que posee propiedades antimicrobianas, así como para el tratamiento de heridas.

La miel es una antigua terapia que ha sido recientemente reintroducida en la medicina moderna, universalmente reconocida y fácilmente accesible (Cooper y Jenkins, 2009). La apicultura es una actividad que resurge con fuerza en el Ecuador, que se presenta como una alternativa sustentable por los pobladores como complemento a su economía rural. El poblador andino ha sabido incorporar las abejas a su vida familiar, produciendo una miel a la que atribuyen poderes curativos y aplicaciones en la medicina tradicional; siendo el aprovechamiento de este producto para efectos medicinales, una tendencia cada vez más acentuada en el comercio local. Además de la miel, también son comercializados otros derivados de la colmena como: polen, jalea real, propóleos y cera (Ratia, 2006).

La propiedad curativa de la miel se debe principalmente a su actividad antibacteriana, manteniendo una condición húmeda en la herida y su alta

viscosidad que ayuda a proporcionar una barrera protectora para prevenir la infección. Su propiedad inmuno-moduladora es relevante también para la reparación de heridas (Mandal y Mandal, 2011). La miel ha sido identificada por sus resultados en el proceso de curación con múltiples efectos positivos y se considera que mejora la circulación y el desarrollo curativo por lo que ha recibido gran atención en el campo de la cicatrización de heridas, especialmente las quemaduras y varios tipos de heridas donde otros métodos de curación no tienen éxito (Meo et al., 2017).

Gracias a sus destacadas propiedades antibióticas y cicatrizantes, hoy en día el uso de la miel en medicina veterinaria se ha ido extendiendo, por lo que en el presente estudio se desea evaluar la capacidad de la miel de aguacate (*Persea americana*) para reducir *in vitro* biopelículas bacterianas en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* como una posible alternativa en el tratamiento de heridas de interés veterinario.

## **1.2. OBJETIVOS**

### **1.2.1. Objetivo General**

Determinar la capacidad antimicrobiana *in vitro* de la miel de aguacate ante *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.

### **1.2.2. Objetivos Específicos**

- Determinar la capacidad de la miel de aguacate para inhibir la formación de biopelículas bacterianas en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.
- Determinar la capacidad de la miel de aguacate para eliminar biopelículas bacterianas preformadas en cepas en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.

### 1.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

Para la población del estudio se seleccionaron un total de 10 apicultores, y por cada apicultor, se tomaron tres muestras al azar de cada colmenar. Las muestras fueron identificadas y seleccionadas sobre la base del número total de colmenares ( $\geq 20$ ).

### 1.4. HIPOTESIS

- H0 La miel de aguacate (*Persea americana*) no posee capacidad para inhibir la formación de biopelículas bacterianas y eliminar biopelículas bacterianas preformadas en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.
- H1 La miel de aguacate (*Persea americana*) posee capacidad para inhibir la formación de biopelículas bacterianas y eliminar biopelículas bacterianas preformadas en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.



## 2. CAPÍTULO II. MARCO REFERENCIAL

### 2.1. MIEL DE ABEJA

#### 2.1.1. Generalidades

La miel, es una sustancia azucarada, producida por las abejas melíferas obreras a partir del néctar de las flores o las secreciones de otras partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas, que las abejas recogen, transforman, transportan y almacenan en panales de la colmena (Méndez et al., 2011) (Cabrera, 2016).

Tabla 1

*Clasificación taxonómica de la abeja melífera.*

Reino	Animal
Subreino	Metazoarios
Filo	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Hymenoptera
Familia	Apidae
Género	Apis
Especie	<i>Mellifera o mellifica</i>
Nombre científico	<i>Apis mellifera o mellifica</i>

Tomado de Mendizábal, 2005.

La conversión de néctar en miel es un proceso complejo. El néctar primero se recoge de una amplia variedad de flores y experimenta maduración por digestión enzimática parcial en el estómago de la abeja (Rahman et al., 2014) (Chamani et al., 2017). Las abejas transforman el néctar y combinan con la enzima invertasa que contiene su saliva y lo almacenan en los panales donde madura. Su composición depende de dos factores principales; del néctar o

néctares, donde va a influir la especie o conglomerado de especies de plantas que producen el néctar, y de factores externos, como la temperatura, almacenamiento y buenas prácticas de manufactura por parte del apicultor (Méndez et al., 2011). Existen muchos tipos diferentes de miel, pero las diferencias se basan en la fuente floral.

Las fuentes florales son responsables de las diferencias en el tipo y nivel de la actividad antimicrobiana y demás propiedades biológicas de la miel. Se basa principalmente en las condiciones ambientales y la ubicación geográfica de las fuentes florales (Meo et al., 2017).



*Figura 1.* Conversión de néctar en las abejas de miel. Tomado de Davidenko, 2015.

## **2.2. Tipos de miel**

Hay cerca de 320 variedades de miel que se originan de varias fuentes florales (Meo et al., 2017). Según Boukraâ (2014) la miel puede clasificarse de acuerdo a su origen floral, modo de producción, consistencia, apariencia y color.

### **2.2.1. Origen floral**

Por su origen botánico se clasifican en:

- Mielles uniflorales o monoflorales: Cuando el producto proceda primordialmente del origen de flores de una misma familia, género o especie y posea características sensoriales, fisicoquímicas y microscópicas propias. Las principales mieles uniflorales son de tomillo manuka, eucalipto, ñachag, nabo, aguacate, entre otros.

- Mieles multiflorales o poliflorales o milflorales: Formada a partir de muchas flores, de las cuales ninguna se puede considerar como la de mayor proporción.

(Valega, 2005).

### **2.3. Propiedades de la miel**

Las características organolépticas y fisicoquímicas de la miel están muy asociadas con el origen geográfico y botánico (Méndez et al., 2011). Las propiedades químicas y físicas de la miel que promueven la actividad antimicrobiana y la cicatrización de heridas se deben al contenido de azúcar, compuestos aromatizantes, ácidos y minerales (Khalil et al., 2014).

#### **2.3.1. Composición química de la miel**

La miel está compuesta de carbohidratos, ácidos orgánicos, minerales, ácidos aromáticos y ceras. También pueden estar presentes compuestos inestables tales como enzimas, hormonas y vitaminas.

El ingrediente más importante de la miel son los carbohidratos presentes en forma de monosacáridos, existiendo al menos 22 tipos diferentes de azúcar en la miel, la mayoría son dextrosa (glucosa) y levulosa (fructosa), aunque también se puede encontrar disacáridos, maltosa, isomaltosa, lactulosa, sacarosa y turanosa; y la dulzura de la miel se debe a la presencia de estos ingredientes.

También contiene oligosacáridos y enzimas como la amilasa, glucosa oxidasa, catalasa y fosforilasa ácida. Además, la miel contiene aminoácidos, vitamina B, vitamina B6, vitamina C, niacina, ácido fólico, minerales, hierro, zinc y antioxidantes (Khalil et al., 2014) (Meo et al., 2017).

La miel esencialmente contiene:

Tabla 2

*Composición química de la miel*

<b>Componentes</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<b>Elementos mayores</b>	
Agua	17 - 22
Fructosa	38
Glucosa	31
Sacarosa	1.5
Maltosa	7.5
<b>Elementos menores</b>	
Ácidos orgánicos (a. Glucónico)	0.57
Proteínas	0.26
Minerales (K, Na, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn, Cu, Se, Rb)	0.04-0.17
Vitaminas solubles en agua (B y C), inhibinas y otros factores antibióticos, pigmentos carotenoides (rojos) y flavonoides (amarillos)	2.21

Tomado de Jean-Prost y Le Conte, 2007; Cabrera, 2016.

La composición química de la miel depende de muchos factores: especies cosechadas, naturaleza del suelo, raza de abejas, estado fisiológico de la colonia, estación, factores ambientales y el procesamiento de miel (Jean-Prost y Le Conte, 2007) (Boukraâ, 2014, p. 411).

### **2.3.2. Propiedades físicas de la miel de abeja**

- Propiedades reológicas

La miel es un producto viscoso y aromático. En la miel, la viscosidad depende tanto de la composición fisicoquímica (humedad, fuente floral,

composición de azúcar, cristalización y sustancias coloidales) como de las temperaturas de la miel. La viscosidad de la miel generalmente disminuye a medida que aumenta la temperatura. (Boukraâ, 2014). La densidad de la miel es de 1.40-1.45g/cm<sup>3</sup> (Cabrera, 2016).

- Color

La miel se clasifica en siete categorías de color: blanco agua, extra blanco, blanco, ámbar extra claro, ámbar claro, ámbar y ámbar oscuro. El índice de color es uno de los factores más importantes en la calidad de las mieles. El origen floral de las mieles, la composición mineral, el contenido químico y el proceso de calentamiento pueden afectar al color. Los componentes colorantes de la miel son pigmentos vegetales tales como clorofila, caroteno, xantofilas y pigmentos de color amarillo-verde (Boukraâ, 2014).

El color de la miel está relacionado con el contenido de polen, fenoles totales, composición mineral e hidroximetilfurfural (HMF) y es característico según el origen floral. Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre miel han mostrado que las mieles de color oscuro exhiben un poder de extinción de antioxidantes y de limpieza de radicales libres. Varios investigadores han informado que las mieles de color claro suelen tener un conteo fenólico total bajo, mientras que las mieles de color oscuro tienen generalmente un contenido fenólico más alto (Boukraâ, 2014).

- Actividad del agua (aw)

La actividad del agua (aw) es la cantidad de agua que está disponible para los microorganismos. La actividad del agua de la miel varía entre 0.562 y 0.620 en el rango de temperatura entre 4°C-37°C (Boukraâ, 2014).

- pH

El promedio del pH de la miel es de 3.5 – 4.5 (Cabrera, 2016).

### **2.3.3. Propiedades biológicas**

Los antioxidantes y flavonoides naturales de la miel tienen una amplia gama de efectos biológicos y propiedades curativas de heridas (Chamani et al.,

2017). La mayoría de las propiedades biológicas de la miel se basan en sustancias fenólicas. Los polifenoles derivados del néctar de las plantas son productos químicos orgánicos naturales caracterizados por la presencia de múltiples unidades estructurales de fenol (McLoone et al., 2016). La miel contiene aproximadamente 0.1% -0.5% de compuestos fenólicos que son responsables de sus actividades antioxidantes, antimicrobianas, antivirales, antiinflamatorias, anticancerígenas y muchas actividades biológicas. Hasta la actualidad, alrededor de 25-30 compuestos fenólicos se han caracterizado en diferentes mieles, muchas de las cuales son uniflorales (Boukraâ, 2014). Los compuestos fenólicos incluyen diferentes subclases que son flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas, estilbenos, lignanos, taninos y polifenoles oxidados (Ferreira et al., 2009).

Tabla 3

*Principales compuestos polifenólicos de la miel*

<b>Compuestos fenólicos</b>	
<b>Clasificación</b>	<b>Componentes</b>
Flavonoides	Pinocembrina
	Pinobanksina
	Apigenina
	Quercetina
	Crisina
	Galangina
	Naringenina
	Kaempferol
	Genisteína
	Luteolina
Miricetina	
Ácidos fenólicos	Ácido p-hidroxibenzoico
	Ácido 4- dimetilaminobenzoico
	Ácido cafeico
	Ácido gálico
	Ácido siringico

	Ácido clorogénico
	Ácido vainílico
	Ácido p-cumárico
	Ácido benzoico
	Ácido elágico
	Ácido cinámico
Taninos	Catequina

Tomado de Muñoz et al., 2007; Estevinho et al., 2008; Álvarez-Suarez et al., 2013.

### **2.3.3.1. Miel de flor de aguacate (*Persea americana*)**

La miel de aguacate proviene del néctar de las flores de aguacate. Es un color ámbar oscuro, sabor distintivo y de altas propiedades nutricionales por su alto contenido en minerales y su poder enzimático, con una humedad del 17 al 18% y rico en antioxidantes (National Honey Board, 2016).

## **2.4. Usos de la miel**

La miel es el único producto natural derivado de insectos, que tiene valor terapéutico, religioso, nutricional, cosmético, industrial y tradicional (Rahman et al., 2014). Es muy valorada por los usuarios con fines terapéuticos como medicina alternativa. La miel tiene acción antibacteriana, antiinflamatoria, antialérgica, antitrombótica, vasodilatadora y propiedades de curación de heridas sin efectos nocivos sobre los tejidos porque contiene antioxidantes y flavonoides. Es eficaz para curar heridas, quemaduras y enfermedades gastrointestinales, y proporciona protección contra las lesiones gástricas. La miel elimina la infección, elimina malos olores, reduce la inflamación y el dolor, y disminuye el edema y la exudación (Chamani et al., 2017). La miel también tiene la capacidad de nutrir y humedecer la piel y disminuir las cicatrices (Boukraâ, 2014).

### **2.4.1. En Medicina y cicatrización**

El conocimiento tradicional de la miel y la ciencia moderna se fusionan en la "apiterapia", que denota el uso médico de miel y productos derivados. La

apiterapia se ha convertido en un foco importante de la investigación que implica la medicina alternativa, porque una amplia variedad de conocidos métodos preventivos o curativos de la medicina popular utilizan la miel para tratar diferentes dolencias y las propiedades terapéuticas de la miel han sido cada vez más documentada en la literatura científica moderna (Rahman et al., 2014). La miel se utiliza comúnmente como un agente antiinflamatorio, antioxidante y antibacteriano (Meo et al., 2017).

La miel se ha utilizado desde la antigüedad como un método para acelerar la cicatrización de heridas y en tratamientos de la piel: sus propiedades higroscópicas ayudan a secar las heridas, y su permeabilidad permite que el oxígeno la atraviese, y el potencial de la miel para ayudar con la cicatrización de heridas ha sido demostrado repetidamente. Hay muchos informes de la miel que es muy eficaz como vendaje de heridas, quemaduras, úlceras de piel e inflamaciones (Mandal y Mandal, 2011) (Bradbear, 2005).

El uso de apiterapia en animales no es tan común como en humanos, siendo tal vez los equinos los que se encuentran más expuestos a las lesiones y por lo tanto los pacientes más tratados con miel. La apiterapia también se usa para el tratamiento de otras enfermedades animales tales como trastornos gastrointestinales, otitis, sinusitis, problemas oftálmicos, dermatología y cuidado de la piel (Boukraâ, 2014).

#### **2.4.1.1. Propiedades Bactericidas de la Miel**

La miel es un agente antimicrobiano de amplio espectro que se ha utilizado en el tratamiento de heridas durante miles de años. Se ha demostrado que inhibe el crecimiento de una amplia gama de bacterias, hongos, protozoos y virus. Es una solución estéril con altas concentraciones de azúcar, bajo contenido de agua y acidez que impide el crecimiento microbiano. Los beneficios terapéuticos de la miel se han identificado como la capacidad de estimular la cicatrización rápida de heridas acelerando el crecimiento de tejido nuevo y la inhibición de los patógenos de la herida (Cooper y Jenkins, 2009) (Mandal y Mandal, 2011) (Bradbear, 2005).

La actividad antibacteriana y la composición de la miel varía según la fuente de miel. Las propiedades antibacterianas de la miel se producen por su alta presión osmótica, contiene enzimas que producen peróxido de hidrógeno que



elimina las bacterias, estimulación de la actividad de los leucocitos, alta acidez, reacción de oxidación de la glucosa, propiedades físicas, baja actividad del agua, pH bajo, bajo contenido de proteínas, alta relación carbono-nitrógeno, un bajo potencial redox debido al alto contenido de azúcares reductores, una viscosidad que limita el oxígeno disuelto y otros agentes químicos, fitoquímicos, antioxidantes, volátiles, flavonoides, cera de abejas, polen de néctar y propóleos. La alta viscosidad de la miel causa una barrera física y un ambiente húmedo, que acelera el proceso de cicatrización de heridas (Chamani et al., 2017) (Bradbear, 2005).

#### **2.4.1.1.1. Actividad peróxida y no peróxida**

La actividad antimicrobiana de la miel se puede dividir en dos mecanismos fundamentales: (i) una actividad antibacteriana no peróxida, debido principalmente a su alta osmolaridad y acidez, así como la presencia de compuestos flavonoides; (ii) una actividad antibacteriana asociada con el peróxido debido al contenido de la enzima glucosa oxidasa (Álvarez-Suarez et al., 2013).

- i. La miel puede retener su actividad antimicrobiana incluso en presencia de catalasa (ausencia de glucosa oxidasa), y por lo tanto este tipo de miel se considera como miel sin peróxido (Mandal y Mandal, 2011).
- ii. Los agentes antimicrobianos en la miel son predominantemente peróxido de hidrógeno, de los cuales la concentración está determinada por los niveles relativos de glucosa oxidasa, sintetizada por la abeja y la catalasa originada del polen de las flores. Las abejas melíferas añaden esta enzima (glucosa oxidasa), al néctar recogido durante el proceso de la fabricación de la miel, que convierte la glucosa en la miel en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y ácido glucónico. El  $H_2O_2$  es tóxico para muchos microorganismos. Durante la maduración de la miel, la glucosa oxidasa se inactiva, pero recupera su actividad si la miel se diluye (McLoone et al., 2016) (Mandal y Mandal, 2011).

#### **2.4.1.1.2. Papel de los flavonoides como antibacterianos**

Las propiedades antibacterianas de los flavonoides se han atribuido a la inhibición del metabolismo de la energía bacteriana, la girasa del ADN

bacteriano y la función de membrana citoplásmica. La miel cruda también puede contener propóleos, una sustancia compuesta de resinas vegetales y utilizada por las abejas para sellar la colmena, que la investigación científica ha demostrado tiene propiedades antimicrobianas (McLoone et al., 2016).

#### **2.4.1.2. Propiedades antiinflamatorias de la Miel**

##### **2.4.1.2.1. Papel de la miel en la prevención y curación de la inflamación**

Se ha reconocido que la aplicación tópica de miel es eficaz en el control de infecciones y en la producción de lecho de tejido de granulación limpia. En general, la miel actúa como un medio hiperosmolar y previene la inflamación (Chamani et al., 2017).

Una forma en que la miel puede trabajar es a través de la estimulación de una respuesta inflamatoria por parte de los leucocitos, e influir en la activación de diversos componentes y células de la matriz celular y extracelular (Boukraâ, 2014). La miel también contiene enzimas de polen de abeja y propóleos, todos los cuales pueden estimular el crecimiento de nuevos tejidos. La miel aumenta la formación de tejido de granulación, la epitelización y la acción de los fibroblastos (Chamani et al., 2017).

La miel también puede acelerar la cicatrización de las heridas reduciendo el edema y la cantidad de exudados. Otro efecto de la miel es reducir el dolor, ya que el dolor en las heridas resulta de las terminaciones nerviosas que se sensibilizan por las prostaglandinas producidas en el proceso de inflamación, así como de la presión sobre los tejidos resultantes de edema (Boukraâ, 2014).

Las propiedades físicas de la miel también aceleran el proceso de curación: su acidez (pH 3.5 – 4.5) aumenta la liberación de oxígeno de la hemoglobina, haciendo que el entorno de la herida sea menos favorable para la actividad de las proteasas destructivas reduciendo así la destrucción de la matriz necesaria para la reparación tisular, y la alta osmolaridad de la miel debido a su alto contenido de azúcar extrae fluido fuera del lecho de la herida para crear un flujo de salida de la linfa. Hay buena evidencia de que la miel también tiene bioactividades que estimulan la respuesta inmune (promoviendo así el crecimiento de los tejidos para la reparación de heridas),

suprimen la inflamación y provocan un rápido desbridamiento autolítico (Molan y Rhodes, 2015).

#### **2.4.1.3. Propiedades antioxidantes de la Miel**

Se ha encontrado que la miel contiene compuestos antioxidantes significativos incluyendo glucosa oxidasa, catalasa, ácido ascórbico, flavonoides, ácidos fenólicos, derivados de carotenoides, ácidos orgánicos, aminoácidos y proteínas (Boukraâ, 2014).

La oxidación es una reacción bioquímica que genera radicales libres en la reacción en cadena que puede dañar las células, los tejidos y, en última instancia, las funciones fisiológicas. Los antioxidantes como la vitamina C terminan las reacciones en cadena para proteger el cuerpo de los radicales libres (Meo et al., 2017).

- La miel contiene potentes agentes antioxidantes, y se ha comprobado que el aumento del compuesto fenólico en la miel proporciona propiedades antioxidantes (Meo et al., 2017). La capacidad antioxidante, que depende del contenido de estos polifenoles, también está correlacionada con su color. La intensidad del color en la miel está relacionada con los pigmentos, y son las mieles oscuras las que han mostrado mayor capacidad antioxidante (Álvarez-Suarez et al., 2013).
- Los contenidos nutritivos de la miel, como la glucosa y la fructosa, mejoran el suministro de sustrato local y pueden ayudar a promover la epitelización (Chamani et al., 2017). Además, el aumento de la vitamina C y otros antioxidantes por efecto de la miel en la concentración sanguínea es particularmente importante para el desarrollo de tejido de granulación y la cicatrización de heridas (Boukraâ, 2014).

### **2.5. BIOPELÍCULAS**

Una biopelícula o biofilm bacteriano es definido como una comunidad estructurada de células bacterianas encerradas en una matriz polimérica auto-producida y adherente a una superficie inerte o viva (Costerton, Stewart y Greenberg, 1999). Las biopelículas pueden estar formadas por especies bacterianas únicas o múltiples (Mah y O'Toole, 2001).

Las bacterias de las matrices de las biopelículas son de 500 a 1500 veces más resistentes a los antibióticos que las bacterias que se mueven libremente (planctónicas), porque son más eficaces metabólicamente, lo que limita su absorción de antibióticos (Fossum, 2009).

La formación de estas comunidades sésiles y su resistencia inherente a los agentes antimicrobianos están en la raíz de muchas infecciones bacterianas persistentes y crónicas (Costerton et al., 1999).

### **2.5.1. Formación de la biopelícula bacteriana**

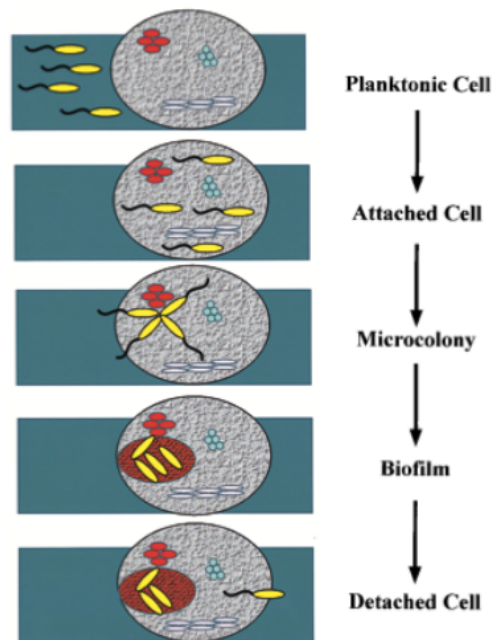
Para que una biopelícula pueda formarse, es fundamental el *quorum sensing* o de auto-inducción, evento que favorece en la síntesis de exopolisacárido, logrando la maduración de la biopelícula y que esta adquiera una conformación tridimensional, llevando a la constitución de canales de agua que ayudan a nutrir el interior del biofilm (Villamizar, 2015).

Debido a que la capacidad para que una biopelícula se forme no se encuentra limitada a ningún grupo de microorganismos en específico, se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todo microorganismo es apto para formar una biopelícula (Lasa, 2004).

En el proceso de autoinducción en bacterias Gram (+) y Gram (-) las moléculas responsables son diferentes, siendo en las Gram (+) los derivados de la acilhomoserina lactona (acil HSL) las responsables de dicho proceso, mientras que en el caso de las Gram (-) los autoinductores corresponden a péptidos. La composición del biofilm varía, pero en general contiene, agua que constituye cerca del 97% del total del contenido, células bacterianas, polímero extracelular y macromoléculas, como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de lisis de las bacterias (Villamizar, 2015) (Lasa, 2004).

Para su formación, primero, la bacteria se acerca a la superficie tan de cerca que la motilidad se desacelera. La bacteria puede entonces formar una asociación transitoria con la superficie y/u otros microbios previamente unidos a la superficie. Esta asociación transitoria le permite buscar un lugar para establecerse. Cuando la bacteria forma una asociación estable como miembro de una microcolonia, ha elegido el barrio en el que vivir. Finalmente,

los edificios se elevan al erigirse una biopelícula tridimensional. Ocasionalmente, las bacterias asociadas a la biopelícula se desprenden de la matriz de la biopelícula (Watnick y Kolter, 2000).



*Figura 2.* Etapas de formación del biofilm. Tomado de Watnick y Kolter, 2000.

### 2.5.2. Infecciones bacterianas por biopelículas

Más de la mitad de las enfermedades infecciosas que afectan a individuos levemente comprometidos involucran especies bacterianas que son comensales con el cuerpo de humanos y animales o son comunes en el ambiente. Se ha estimado que las biopelículas están asociadas con el 65% de las infecciones nosocomiales (Mah y O'Toole, 2001).

Las infecciones producidas por complejos de biopelículas bacterianas suelen ser difíciles y caras de tratar. Para que se forme una biopelícula con importancia clínica, las bacterias deben unirse a los tejidos o a una superficie inanimada, como un implante de metal, un catéter o una sutura, del organismo del paciente y atraer a otras células bacterianas y unirse a ellas. Puesto que los residentes normales de la piel no suelen provocar una respuesta inmunitaria en el paciente, al principio estas infecciones no se reconocen y no se tratan (Fossum, 2009). Adicionalmente, dentro de una

biopelícula, las bacterias se encuentran protegidas del ataque de las células fagocíticas de la acción de los anticuerpos, y de los tratamientos antimicrobianos (Lasa, 2004).

Las biopelículas crecen lentamente, en una o más ubicaciones, y las infecciones por biofilm a menudo son lentas para producir síntomas manifiestos (Costerton et al., 1999). Una característica que distingue las infecciones agudas de las infecciones crónicas relacionadas con biopelículas es su respuesta a tratamientos antibióticos. Las infecciones agudas pueden ser eliminadas tras una breve terapéutica, mientras que las infecciones por biopelículas normalmente no logran ser completamente eliminadas y producen episodios recurrentes (Lasa, 2004).

#### **2.5.2.1. Mecanismos de resistencia**

Lasa (2004) menciona que entre los mecanismos responsables de la resistencia se incluyen: (i) la barrera de difusión física y química a la penetración de los antimicrobianos que constituye la matriz de exopolisacáridos; (ii) el crecimiento ralentizado de las bacterias del biofilm debido a la limitación de nutrientes; (iii) la existencia de microambientes que antagonicen con la acción del antibiótico; y (iv) la activación de respuestas de estrés que provocan cambios en la fisiología de la bacteria y la aparición de un fenotipo específico del biofilm que activamente combata los efectos negativos de las sustancias antimicrobianas.

#### **2.5.3. Evidencias que relacionan el biofilm con enfermedades en animales**

La formación de biopelículas es un evento multifactorial, cuyo éxito depende directamente de la superficie escogida, del tiempo de contacto, cepas bacterianas (heterogeneidad) y las condiciones del microambiente en el que se desarrolle.

Estudios sugieren que enfermedades bacterianas o fúngicas que se resisten a los tratamientos terapéuticos o a los mecanismos defensivos inmunológicos se asocian a la colonización y la formación de biopelículas. En este sentido, buscando dar calidad de vida al paciente animal y disminuir la carga bacteriana que pueda condicionar procesos infecciosos generados por

consorcios, es importante implementar programas de valoración microbiológica de ambientes, superficies, equipos e instrumental quirúrgico en conjunción con programas de limpieza y desinfección estandarizados, con el fin de eliminar los consorcios bacterianos que puedan estar presentes.

## 2.6. MICROORGANISMOS PATÓGENOS

### 2.6.1. Género *Staphylococcus*

Son microorganismos esféricos de 0.5-1.2  $\mu\text{m}$  de diámetro, se agrupan en racimos, aunque pueden observarse en pares, cadenas cortas e inclusive solos. Gram positivos, no esporulados, generalmente sin cápsula, anaerobios facultativos, no móviles y con metabolismo fermentativo (Velasco y Yamasaki, 2002). Las colonias generalmente son blancas o blanquecinas, con superficies lisas y consistencia butírica (Songer y Post, 2004). Una propiedad notable de los estafilococos es su capacidad para volverse resistentes a los antimicrobianos (Weese y van Duijkeren, 2010).

**Hábitat:** Piel y mucosas de animales y hombre (incluyendo tracto gastrointestinal y respiratorio) (Velasco y Yamasaki, 2002).

**Medios de cultivo y pruebas bioquímicas importantes:** No son muy exigentes y crecen en los medios comunes que contienen peptonas y extractos de carne, pero crecen mejor si el medio contiene sangre, ácido nicotínico, tiamina y biotina. Son adecuados: Agar manitol sal (medio selectivo y diferencial), Chapman Stone, *Staphylococcus* 110, Agar sangre entre otros. La prueba bioquímica de Catalasa es positiva para todo el género y las pruebas de coagulasa, crecimiento en manitol, acetoína y trealosa así como la producción de pigmento y el patrón de hemólisis, son pruebas para identificación de especies (Velasco y Yamasaki, 2002).

#### 2.6.1.1. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* es un importante patógeno oportunista en humanos y una de las especies de *Staphylococcus* patógenas más importantes en

medicina veterinaria. *S. aureus* es peligroso debido a sus efectos nocivos sobre la salud animal y su potencial para la transmisión de animales a humanos y viceversa. Por lo tanto, tiene un gran impacto en la salud y el bienestar animal y causa grandes pérdidas económicas en la producción ganadera. Por lo tanto, se está prestando cada vez más atención al ganado y a los animales de compañía en lo que respecta a este patógeno (Peton y Le Loir, 2014).

Muchas cepas de *Staphylococcus aureus* tienen un pigmento dorado del cual el organismo toma su nombre (Songer y Post, 2004).

La mayoría de las infecciones que causan lo hacen cuando la piel o las membranas mucosas se ven comprometidas de alguna manera. Las infecciones por *S. aureus* a menudo comienzan en alguna brecha en la barrera epitelial, ya sea queratinizada, mucosa o conjuntival, y el establecimiento de la infección se ve facilitado por cuerpos extraños, como catéteres o suturas (Songer y Post, 2004).

**Enfermedad en animales:** *Staphylococcus aureus* produce gran variedad de infecciones supurativas en heridas (abscesos), mastitis, endometritis, cistitis, osteomielitis, piodermas en corderos, perros, gatos, aves (Velasco y Yamasaki, 2002). *S. aureus* también puede estar asociado con infecciones otorrinolaringológicas en perros y gatos (otitis o superinfecciones del tracto respiratorio superior) (Peton y Le Loir, 2014).

**Factores de virulencia:** *Staphylococcus aureus*: Proteína A, estafilokinasa, leucocidina, hialuronidasa, coagulasa, enterotoxina, hemolisinas alfa, beta y gamma, toxina epidermolítica (Velasco y Yamasaki, 2002).

### 2.6.2. Género *Klebsiella*

El género *Klebsiella* contiene organismos bacilos gramnegativos encapsulados no móviles anaeróbicos facultativos, que son positivos para Voges-Prokauer, hidrolizan urea, fermentan inositol y utilizan citrato, pero no producen ornitina descarboxilasa ni sulfuro de hidrógeno (Songer y Post, 2004).



*Klebsiella spp.* han sido asociados con muchas formas de infecciones oportunistas. El equipo obstétrico contaminado, el equipo quirúrgico, los dispositivos de limpieza y las superficies de la clínica pueden contribuir a la probabilidad de infección.

**Hábitat:** *Klebsiella spp.* son comunes en la naturaleza, donde se encuentran en aguas superficiales, aguas residuales, suelo y en material vegetal. Klebsiellae son comensales del tracto intestinal de mamíferos (Songer y Post, 2004).

**Medios de cultivo y pruebas bioquímicas importantes:** Las Klebsiellae se aíslan fácilmente por cultivo bacteriológico produciendo grandes colonias, en agar sangre son no hemolíticos, brillantes, redondos, viscosos y mucoides, grises con márgenes, y de 2 a 3 mm de diámetro después de la incubación de 24 horas a 37°C. Facultativamente anaerobio, oxidasa negativo, fermenta la lactosa y generalmente son indol-negativos (Songer y Post, 2004) (McVey, Kennedy y Chengappa, 2013).

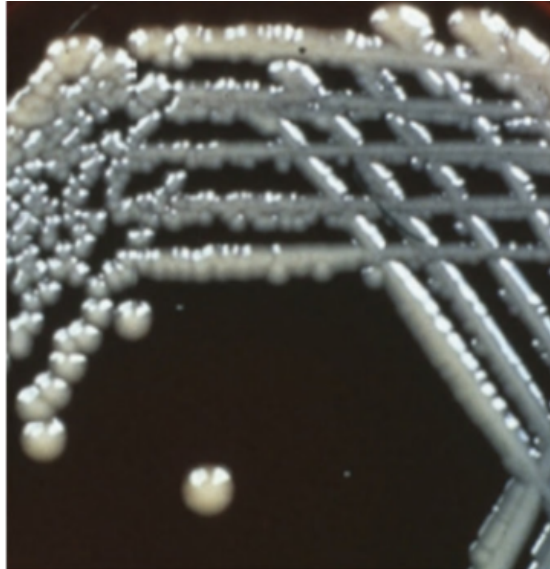
#### **2.6.2.1. *Klebsiella pneumoniae***

Esta bacteria es un patógeno oportunista. Además, *Klebsiella* puede adquirir resistencia a múltiples antibióticos y es una causa importante de enfermedades nosocomiales e infecciones del tracto urinario de humanos y animales hospitalizados (Songer y Post, 2004) (Roberts et al., 2000).

**Enfermedad en animales:** *Klebsiella pneumoniae* se ha asociado con una variedad de procesos infecciosos en animales, incluyendo mastitis bovina, metritis equina, y septicemia neonatal en potros, terneros y es causa de diversas infecciones en perros, aves de compañía, aves de corral y reptiles cautivos (Songer y Post, 2004).

*Klebsiella pneumoniae* se ha recuperado de una amplia gama de infecciones caninas. Las manifestaciones de la enfermedad incluyen piometra, cistitis, prostatitis, neumonía, meningoencefalitis, enteritis, mastitis, septicemia neonatal, abscesos hepáticos y otitis externa. (Songer y Post, 2004).

**Factores de virulencia:** Los factores de virulencia pueden incluir su cápsula, endotoxinas, enterotoxinas, adhesinas y sideróforos. La cápsula es esencial para la virulencia, lo que permite la unión a las células epiteliales en los tractos urinario y respiratorio (Songer y Post, 2004).



*Figura 3.* Grandes colonias viscosas mucoides de *Klebsiella pneumoniae* cultivadas en agar sangre. Tomado de Songer y Post, 2004.

### 3. CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Ubicación geográfica

El estudio se realizó en la Provincia de Pichincha, cantón Quito. La ciudad de Quito se localiza en la zona centro-norte del Ecuador. **Latitud:** La ciudad de Quito se caracteriza por su terreno irregular, sus coordenadas son Latitud: -0.2298500°, Longitud: -78.5249500°. **Clima y Altitud:** El clima de la ciudad corresponde al clima subtropical de tierras altas con predominio de temperaturas que fluctúan entre los 8-24 °C dependiendo de la zona, tiene una altitud que oscila desde los 2850 msnm a los 3100 msnm. **Límites:** Limita hacia el este con una serie de lomas como Puengasí, Guanguiltagua e Itchimbía. Hacia el sur se extiende hasta el sector de Tambillo y al norte hacia Pomasquí-San Antonio.

La investigación se dio dentro de los laboratorios de investigación de la Universidad de las Américas (UDLA), Sede Queri, en la ciudad de Quito.

#### 3.2. Materiales

##### 3.2.1. Materiales de laboratorio

- Vaso de precipitación 10 ml Glassco®
- Vaso de precipitación 100 ml Boeco®
- Matraz volumétrico de 500 ml Boeco®
- Tubos de ensayo con tapa rosca Marienfeld®
- Gradilla para tubos de ensayo
- Matraz cónico
- Crisol
- Papel filtro
- Pipeta Pasteur
- Colorímetro de Pfund
- Medidor de pH
- Placa de microtitulación de 96 pocillos Synergy™ Multi-Detection Microplate Reader, Bio-Tek®
- Tubo de microcentrifuga Eppendorf®

### 3.2.2. Equipos

- Incubadora de laboratorio Memmert
- Espectrofotómetro Instrulab Q
- Refractómetro
- Conductímetro
- Balanza analítica ©Mettler-Toledo
- Baño de agua (Baño María) HACH
- Agitador magnético
- Horno mufla
- Plancha de calentamiento
- Desecador

### 3.2.3. Sustancias o Reactivos

- Miel floración de aguacate
- Solución de miel artificial
- Medio de digerido de soja y caseína (Tryptic Soy Broth: TSB)
- Agar nutritivo
- Tampón fosfato salino (PBS)
- Agua destilada
- Alcohol
- Sulfato ferroso de amonio
- Ácido sulfúrico
- Naranja de xilenol
- Sorbitol
- Solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Azul de metileno
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Solución de yodo
- Solución de almidón
- Solución de cloruro de sodio
- Buffer acetato
- Solución de Carrez I
- Solución de Carrez II

- Bisulfito de sodio 0.1%

### **3.2.4. Material biológico**

- Cepas bacterianas:
  - o *Staphylococcus aureus* CAMP
  - o *Klebsiella pneumoniae* KPC 609803

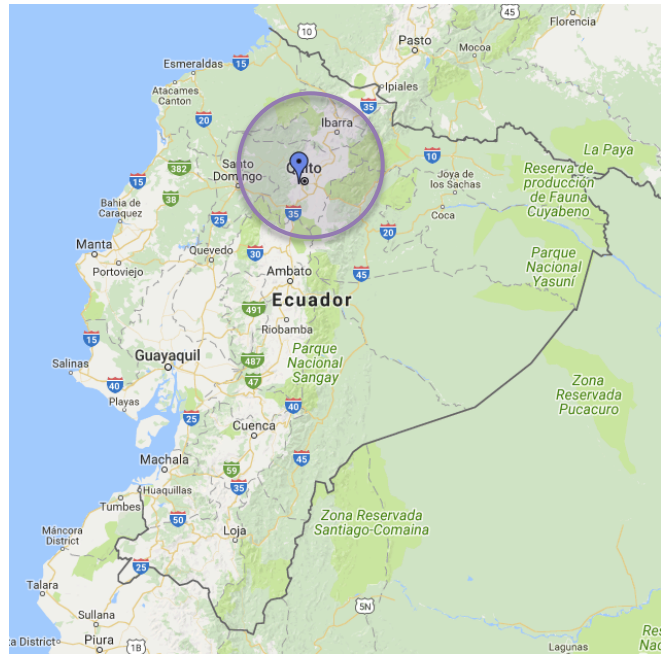
## **3.3. Metodología**

### **3.3.1. Muestras de miel**

Se recolectaron muestras de miel monofloral (fuente floral: Aguacate *Persea americana*) directamente de apicultores de acuerdo con los datos proporcionados por la Agencia Ecuatoriana para el Aseguramiento de la Calidad Agropecuaria (AGROCALIDAD, Ecuador), en la provincia de Pichincha, ubicada en la región interandina de Ecuador. Los cantones de donde se tomaron las muestras, y sus respectivos distritos fueron: Quito (Tumbaco, Chillogallo, Amaguaña y Pintag), Cayambe (Cangahua) y Mejía (Machachi).

Se seleccionaron un total de 10 apicultores, sobre la base del número de colmenares ( $\geq 20$ ), que constituían aproximadamente el 50% del total de las colmenas en la provincia. Por cada apicultor, se tomaron tres muestras al azar de cada colmenar. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente y los diferentes análisis se realizaron dentro de un período de tiempo que no excedió los tres meses desde la fecha de recolección. Los apicultores se identificaron como Bee1 a Bee10 y los resultados se expresaron como los valores medios obtenidos de los análisis de las tres muestras de cada apicultor.

Se incluyó una solución de miel artificial para eliminar cualquier interferencia que pudiera producirse a partir de estos compuestos en las pruebas realizadas. Se prepararon 100 g de miel artificial, disolviendo 1.5 g de sacarosa, 7.5 g de maltosa, 40.5 g de fructosa y 33.5 g de glucosa en 17 ml de agua desionizada estéril. Esta solución representa las proporciones de los cuatro azúcares predominantes en las muestras de miel natural (Cooper et al., 2002).

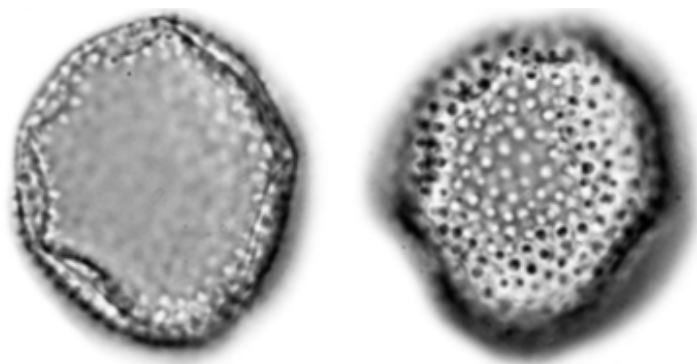




*Figura 4.* Mapa de la procedencia de la miel de Aguacate (Prov. Pichincha-Quito (Tumbaco, Chilligallo, Amaguaña y Pintag), Cayambe (Cangahua) y Mejía (Machachi)).

### 3.3.2. Contenido de polen

El origen botánico fue confirmado por el análisis microscópico cualitativo tradicional y la determinación de frecuencia de las clases de granos de polen en las muestras de miel siguiendo el protocolo previamente informado (Louveaux, Maurizio y Vorwohl, 1970; Von Der Ohea, Oddob, Pianab, Morlotc, y Martin, 2004). La morfología de los granos de polen se comparó con la de un catálogo publicado de polen (Montoya-Pfeiffer, León-Bonilla y Nates-Parra, 2014).



*Figura 5.* LAURACEAE. *Persea americana*. Granos asimétricos, apolares, inaberturados, esferoidales, ámbito circular, de 37--550µm de diámetro. Exina: 1µm, microequinada. Tomado de Montoya-Pfeiffer et al., 2014.

### **3.3.3. Análisis fisicoquímico**

Las determinaciones fisicoquímicas se realizaron de acuerdo con los métodos estandarizados propuestos por la International Honey Commission (IHC) (Känzig, Kaufmann y Bogdanov, 2001).

#### **3.3.3.1. Determinación de color en miel**

El color se determinó usando un graduador de color Pfund Koehler, que de acuerdo a Delmoro et al., (2010) es el método estandarizado para medición de color en miel, basado en la comparación óptica, utilizando un colorímetro. Para realizar la determinación del color, se diluyó 5 ml de agua destilada por cada 2.5 g de muestra de miel de aguacate. Luego, esta solución fue vaciada en una celda o cubeta para espectrofotómetro. Se dejó reposar durante 10 minutos y se procedió a realizar la lectura espectrofotométrica, y los resultados se expresaron como mm Pfund.

#### **3.3.3.2. Análisis de acidez y pH en miel**

Se realizó el análisis según un protocolo modificado de acuerdo con lo que exige la Norma Mexicana NMX-F-036-1997-NORMEX «Alimentos-Miel-Especificaciones y Métodos de Prueba» (2000).

Se pesó 5 g de miel de aguacate en un vaso de precipitación de 100 ml, para su posterior dilución en 37.5 ml de agua destilada. El pH se midió en una solución de miel en agua ultrapura usando un medidor de pH.

Se estableció el pH inicial, para luego titular con hidróxido de sodio 0.05 N, deteniendo la adición cuando se alcanza un pH de 8.5, y seguidamente se completó con 5 ml de hidróxido de sodio 0.05 N para retitular por retroceso con ácido clorhídrico 0.05 N hasta alcanzar un pH de 8.3. Al finalizar, se anotaron el volumen de NaOH y HCl adicionados a la solución de miel y se ejecutó el cálculo. Los resultados se expresaron en meq/kg.

#### **3.3.3.3. Determinación de la conductividad eléctrica**

Se determinó la conductividad eléctrica empleando la metodología modificada descrita por Sanz y Sanz (1994). Se procedió diluyendo 5 g de miel en 25 ml de agua destilada. Esta solución se midió a 20°C utilizando un conductímetro. Los resultados obtenidos se expresaron como mS/cm.



#### **3.3.3.4. Determinación de la actividad de la enzima diastasa en miel**

El principio del método está basado en el procedimiento descrito por Schade et al., (1958) modificado por White y Pairent (1959) y Hadorn (1961); y descrito en la Norma Mexicana NMX-F-036-1997-NORMEX (2000).

Antes de realizar la determinación, se debe tener listo los reactivos y soluciones para poder ejecutar el procedimiento.

Se calentó la solución de almidón (fécula de papa + etanol + ácido clorhídrico) a 40°C, adicionando 5 ml de solución de almidón en 10 ml de agua. Se llevó a cabo la reacción con una solución de yodo 0.0007 N (yoduro de potasio reactivo analítico + agua destilada + solución primaria de yodo), y se leyó la absorbancia, ensayando distintas diluciones con agua destilada hasta lograr una absorbancia de  $0.760 \pm 0.02$ .

Para la solución de miel se pesó 2 g de miel de aguacate en un vaso de precipitación de 10 ml y se añadió 1 ml de solución amortiguadora de acetato y 4 ml de agua destilada. Se adicionaron a la mezcla 0.6 ml de solución de cloruro de sodio.

Se procedió a calentar en un baño de agua dos tubos de ensayo, uno conteniendo 2 ml de solución de miel, y el otro 1 ml de solución de almidón, a una temperatura de 40°C durante un periodo de 10 minutos. Pasado ese tiempo se acopló el contenido de ambos tubos para llevar a cabo la reacción. A intervalos de 5 minutos se tomó una muestra de 50 uL de la reacción realizada previamente, colocándolo en un tubo de microcentrífuga que contenía 500 uL de solución de yodo 0.0007 N, mezclándola, y procediendo a realizar la medición espectrofotométricamente. Se realizó la toma de muestra (c/5 min) hasta obtener una absorbancia menor a 0.235 nm. Para determinar el índice de diastasa se realizaron los cálculos pertinentes y los resultados se expresaron en unidades Gothe por gramo de miel.

#### **3.3.3.5. Determinación del contenido de Hidroximetilfurfural (HMF)**

La determinación del contenido de HMF se basa en el método alternativo de Carrez definido en la Norma Mexicana NMX-F-036-1997-NORMEX (2000).

Se realizó la preparación de la muestra pesando 5 g de miel disolviéndolo con 25 ml de agua destilada.

Luego se agregaron 0.5 ml de solución de Carrez I a la muestra y se la homogenizó. Posteriormente se sumaron 0.5 ml de solución de Carrez II a la solución de miel y se aforó a volumen con agua destilada. Se filtró a través de un papel filtro, procediendo a tomar 5 ml del filtrado, distribuyéndolo en dos tubos de ensayo. Se adicionó 5 ml de agua destilada en uno de los tubos (muestra) y 5 ml de bisulfito de sodio 0.1% en el otro tubo (referencia). Se determinó espectrofotométricamente la absorbancia después de haber agitado enérgicamente ambos tubos, a dos longitudes de onda: 284 y 336 nm. Los resultados se expresaron en mg/kg por gramo de miel.

#### **3.3.3.6. Determinación del contenido de humedad**

Para la determinación de la humedad, se basó en el método por refractometría de Wedmore, establecido en la Norma Mexicana NMX-F-036-1997-NORMEX (2000).

Se pesaron 0.1 g de miel y se colocó la muestra a 20°C en el refractómetro, observando a contraluz para tomar la lectura directamente. Los resultados se expresaron como % de humedad.

#### **3.3.3.7. Determinación del porcentaje de cenizas**

Se determinó el porcentaje de cenizas mediante el método descrito en la Norma Mexicana NMX-F-036-1997-NORMEX (2000). Se inició pesando el crisol y anotando su peso, antes de la colocación de la muestra de miel de aguacate. Consecutivamente, se pesaron 2.5 g de la miel. Se calcinó la muestra en una plancha de calentamiento hasta que se haya evaporado la mayor cantidad de líquido posible en la muestra y ya no desprenda humo. Subsiguientemente, se ubicó en el horno mufla a una temperatura de 500°C durante un periodo de 4 horas. Después, se situó la muestra en un desecador y se dejó reposar durante una hora. Pasado este tiempo, se pesó y se realizó el cálculo correspondiente de acuerdo a los pesos registrados al inicio del experimento.

### 3.3.4. Actividad antimicrobiana

#### 3.3.4.1. Contenido de peróxido de hidrógeno en las muestras de miel

El contenido de peróxido de hidrógeno se determinó utilizando el método FOX-1 (Oxidación Ferrosa - Naranja de Xilenol) modificado para la microdeterminación de peróxido de hidrógeno en muestras de miel.

El método se basa en el principio de la oxidación mediada por peróxido de  $\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}$  + condiciones ácidas. Este último, en presencia de naranja de xilenol, forma un complejo  $\text{Fe}^{3+}$  + naranja de xilenol que se puede medir espectrofotométricamente a 560 nm. La calibración con peróxido de hidrógeno, proporciona un coeficiente de extinción aparente medio de  $4.52 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  consistente con una longitud de cadena de aproximadamente 3 para la oxidación de iones ferrosos mediante hidroperóxidos (Jiang, Hunt y Wolff, 1992).

La solución de trabajo FOX-1 fue una mezcla recién preparada de 25 mM de sulfato ferroso de amonio (sal de Mohr) en 0.25 M de ácido sulfúrico con una solución que consistía en 62.51 M de naranja de xilenol y 150 mM de sorbitol en una proporción de 1:100. Luego, se añadieron 80  $\mu\text{L}$  de una solución de miel adecuadamente diluida a 160  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo FOX-1. Esta mezcla se incubó en la oscuridad durante 30 minutos, y luego se leyó la absorbancia a 580 nm usando un lector automático de microplacas de 96 pocillos (Synergy™ Multi-Detection Microplate Reader, Bio-Tek®, Instruments, Inc., EE. UU.). Para cada análisis, la interferencia de fondo del reactivo FOX-1 se sustrajo a la muestra. Una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se utilizó como estándar para la confección de la curva patrón. Esta solución se preparó diluyendo una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%) a una concentración final de 3.4 mg/ml. Para preparar la curva de calibración, se transfirieron cantidades variables de la solución madre de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , diluida 5000 veces, a una placa de 96 pocillos y se completó hasta un volumen final de 80  $\mu\text{L}$  con agua destilada para obtener rangos de dilución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 0.0136  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 0.68  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Después se añadieron alícuotas (160  $\mu\text{L}$ ) del reactivo FOX-1 recién preparado a cada pocillo, se incubó durante 30 min y se leyó a 580 nm usando un lector automático de microplacas de 96 pocillos. El contenido de

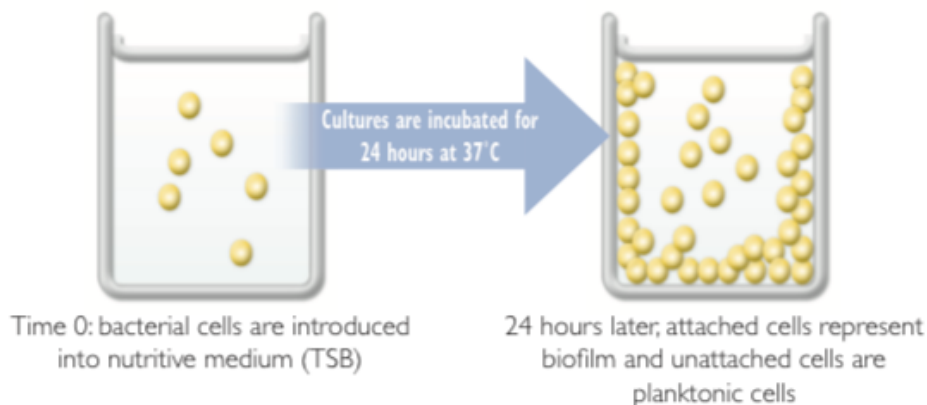
peróxido de hidrógeno en las muestras de miel se expresó como  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de miel.

### **3.3.5. Determinación de la capacidad de la miel para inhibir la formación de biopelículas y eliminar la biopelícula preformada**

La capacidad de la miel para inhibir la formación de biopelícula se determinó utilizando el ensayo de formación de biopelícula en una placa de microtitulación descrita por estudios publicados (Lu et al., 2014).

Las bacterias fueron provistas por el laboratorio de microbiología de la Universidad de las Américas. Los cultivos se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta que se requerían. Se cultivaron durante una noche ( $\sim 12$  horas) en TBS (Tryptone Soy Broth) a  $37^{\circ}\text{C}$  y se mantuvieron en agar nutritivo entre experimentos.

Se usaron dos cepas bacterianas: un grampositivo (*Staphylococcus aureus* CAMP) y un gramnegativo (*Klebsiella pneumoniae* KPC 609803) en el ensayo. Las cepas bacterianas se cultivaron en TBS en agitación (90 rpm) a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 18 horas. La suspensión de cultivo se diluyó 0.5 veces en la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC) y se transfirieron  $100 \mu\text{L}$  de esta dilución a una placa de 96 pocillos. Luego, se añadieron  $100 \mu\text{L}$  de TBS que contenía la solución de prueba apropiada (aguacate o miel artificial al 20% y 10%) y la placa se incubó durante 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación (90 rpm). El medio de TBS con o sin solución de miel sin inoculación de bacterias se usó como controles negativos. Después de la incubación, se eliminó el crecimiento de células planctónicas (sobrenadante) y las placas se trataron con azul de metileno para la cuantificación espectrofotométrica de la biopelícula adherida. La formación de biopelícula se expresó como un porcentaje relativo al producido por el control no tratado, que se estableció como 100%.



*Figura 6.* Formación de la biopelícula. Tomado de Cooper, Jenkins y Rowlands, 2011.

Para determinar la capacidad de la miel para eliminar la biopelícula preformada, se formaron primero biopelículas en la placa de microtitulación de 96 pocillos durante 24 horas a 37°C como se describió anteriormente. Después, las biopelículas se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con la solución de prueba apropiada (aguacate y miel artificial a 20°C y 10%) durante 24 horas más a 37°C. Se eliminó la célula planctónica y se cuantificó la masa de la biopelícula como en el experimento anterior. La formación de biopelícula se expresó como un porcentaje relativo al producido por el control no tratado, que se estableció como 100%.

### 3.3.6. Estadística

Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (DE). Los análisis estadísticos se realizaron con IBM® SPSS Statistics® para Windows versión 20.0. Se usó análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar diferencias significativas entre muestras usando una corrección de Bonferroni para la comparación de los resultados estadísticos de muestras múltiples. En todos los casos, se consideró un valor  $P < 0.05$  como estadísticamente significativo.

## 4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Análisis fisicoquímico

La Tabla 4 muestra los resultados del análisis fisicoquímico realizado en el tipo de miel monofloral en estudio (aguacate, *Persea americana*).

Tabla 4

*Parámetros fisicoquímicos en miel de aguacate del Ecuador.*

Parámetros	Miel de aguacate
	Valores
<b>Parámetros fisicoquímicos</b>	
Color (mm Pfund)	137.29 ± 66.97
Humedad (%)	16.42 ± 2.53
pH	5.23 ± 0.96
HMF (mg/kg de miel)	27.16 ± 30.43
Índice de diastasa (°Gothe)	47.65 ± 34.95
Conductividad eléctrica (mS/cm)	1.31 ± 0.472
Contenido de cenizas (%)	1.05 ± 0.13

#### 4.1.1. Análisis de color en miel

De acuerdo a la determinación de color realizada en la miel, se obtuvo un valor de 137.29. Según el análisis de color, la miel de aguacate podría clasificarse como ámbar oscuro (valores >114 mm Pfund), lo que está en línea con los valores informados previamente para este tipo de miel, siendo también descrito que el color de las mieles oscuras está muy correlacionado con la concentración de los oligoelementos (As, Cd, Fe, S y Pb) (Bentabol-Manzanares et al., 2014; González-Miret et al., 2005). Adicional, según Vela et al., (2007), una miel de color más oscuro se ha asociado con un mayor contenido de compuestos fenólicos y una mayor capacidad antioxidante.

#### **4.1.2. Acidez y pH en miel**

La miel es conocida por su naturaleza ácida, sin embargo, en la actualidad no se han establecido los rangos de pH para la miel *Apis mellifera*, de ahí la importancia de comparar los resultados con los reportados en miel de regiones similares y con los informados por otros autores. El valor de pH obtenido en la muestra analizada de miel de aguacate fue de 5.23, siendo su valor similar a los reportados en la miel de aguacate de España, encontrándose en un rango de 4.12-5.21 (Terrab y Heredia, 2004; Bentabol-Manzanares et al., 2014).

#### **4.1.3. Conductividad eléctrica y porcentaje de cenizas**

Las regulaciones europeas establecen un límite máximo para la conductividad eléctrica (EC) en miel de flores por debajo de 0.8 mS/cm (The Council of the European Union, 2002). Según los resultados aquí expuestos, la miel de aguacate presentó un valor alto de CE, siendo este 1.31 mS/cm, que además se encuentra por encima de los límites recomendados (0.8 mS/cm). Este resultado es consistente con los reportados previamente para esta miel monofloral de España con valores superiores a 0.8 Sm/cm (Bentabol-Manzanares et al., 201; Terrab y Heredia, 2004).

Se observó un comportamiento similar en el contenido de cenizas, donde la miel de aguacate presentó un alto contenido de las mismas, incluso superando los límites recomendados para la miel *Apis mellifera* (0.6%) (The Council of the European Union, 2002). El resultado de cenizas en la miel de aguacate informado en este trabajo fue de 1.05%, valores que concuerdan con los reportados anteriormente en la miel de aguacate de España, que notificaron valores promedio superiores al 0.77% (Terrab y Heredia, 2004). La CE en miel se encuentra relacionada con la concentración de cenizas, encontrándose una gran variabilidad según el origen floral y representando un parámetro importante para diferenciar la miel según el origen floral (Persano Oddo et al., 2004). Se encontró una alta correlación entre la CE y el contenido de cenizas, lo que podría justificar, en parte, los altos valores encontrados en la CE y que coinciden con los valores previamente reportados por Gomes et al., (2010).

#### **4.1.4. Hidroximetilfurfural (HMF) y el índice de diastasa**

El HMF y el índice de diastasa se utilizan como indicadores de la frescura de la miel (The Council of the European Union, 2002). En la miel fresca, la HMF podría estar ausente o ser baja en cantidad, mientras que los altos niveles de HMF ( $> 80$  mg / Kg) pueden sugerir condiciones inadecuadas de manejo y almacenamiento influenciadas por factores como la temperatura y el pH (Fallico et al., 2006). Los valores de HMF en el tipo de miel monofloral analizada se encontraba dentro de los rangos recomendados (27.16 mg/kg) para la miel *Apis mellifera* con origen declarado en climas tropicales, lo que sugiere un proceso adecuado de procesamiento, almacenamiento y/o envejecimiento por parte de los apicultores; además por ese aspecto, se puede pensar que la miel analizada aquí puede considerarse como miel fresca.

De acuerdo con la legislación internacional, el índice de diastasa debe ser superior a 8 unidades Schade (The Council of the European Union, 2002); los valores más bajos podrían interpretarse como envejecimiento o abuso de temperatura. De acuerdo con los resultados obtenidos, la muestra del tipo de miel monofloral analizada se encontraba dentro de los límites recomendados y en línea con la regulación internacional para estos parámetros (The Council of the European Union, 2002).

#### **4.1.5. Contenido de humedad**

El contenido de humedad en la miel de *Apis mellifera* está bien definido en los estándares internacionales de calidad (The Council of the European Union, 2002). Dado que un alto contenido de humedad puede afectar la calidad de la miel y sus propiedades organolépticas y actividad biológica (Chirife et al., 2006), el contenido de humedad en la muestra de miel de aguacate se analizó y comparó con estándares internacionales (The Council of the European Union, 2002). De acuerdo con el resultado obtenido (16.42%), la muestra de miel estuvo dentro del rango permisible para miel de regiones tropicales ( $\leq 20$ ). El contenido de humedad en la miel se encuentra en función con las condiciones ambientales y geográficas, humedad original del néctar, el manejo de los colmenares, y después de su extracción: el almacenamiento de la miel, por lo que los resultados aquí expuestos sugieren



las condiciones adecuadas de manejo y almacenamiento de la miel por parte de los apicultores.

## **4.2. Capacidad antibacteriana**

### **4.2.1. Efecto de la miel para inhibir la formación de la biopelícula y eliminar la biopelícula preformada en *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae***

Se atribuye la actividad antimicrobiana de la miel a dos mecanismos principales, la actividad sin peróxido y los componentes dentro de su composición, indicados anteriormente en el marco teórico.

La actividad antimicrobiana de la miel ha sido bien documentada y relacionada con el origen floral (Cokcetin et al., 2016) y las especies de abejas (Álvarez-Suarez et al., 2018; de Almeida-Muradian et al., 2013), lo que ha sugerido una posible relación entre esta propiedad biológica y los factores mencionados con anterioridad.

El peróxido de hidrógeno, se produce normalmente en las células en la cadena respiratoria mitocondrial, mediante reacciones de hidroxilación y de oxigenación, y se encuentra presente como parte de la respuesta inflamatoria ante una lesión o infección. La presencia del peróxido de hidrógeno estimula el crecimiento de fibroblastos y células epiteliales para reparar el daño (Burdon, 1995). El peróxido de hidrógeno también estimula el desarrollo de nuevos capilares en el tejido de la herida (Tur et al., 1995).

En este sentido, se analizó la capacidad del tipo de miel monofloral estudiada (miel de aguacate) para reducir las biopelículas bacterianas *in vitro* en dos cepas bacterianas para determinar su capacidad antimicrobiana.

La biopelícula bacteriana generalmente se establece en heridas abiertas y crónicas antes de la presentación del paciente a una clínica para recibir tratamiento médico, lo que dificulta su posterior terapia. Por lo tanto, se estudió la capacidad de la miel monofloral de aguacate para reducir la biopelícula preformada, así como su capacidad para inhibir la formación de

biopelícula bacteriana utilizando dos cepas bacterianas: un grampositivo (*Staphylococcus aureus* CAMP) y un gramnegativo (*Klebsiella pneumoniae* KPC 609803).

Dado que la actividad antimicrobiana de la miel se ha relacionado estrechamente con la actividad asociada a los peróxidos en la miel (Kwakman y Zaat, 2012), se determinó el contenido total de peróxido de hidrógeno en la muestra de miel: 9.40 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/kg.

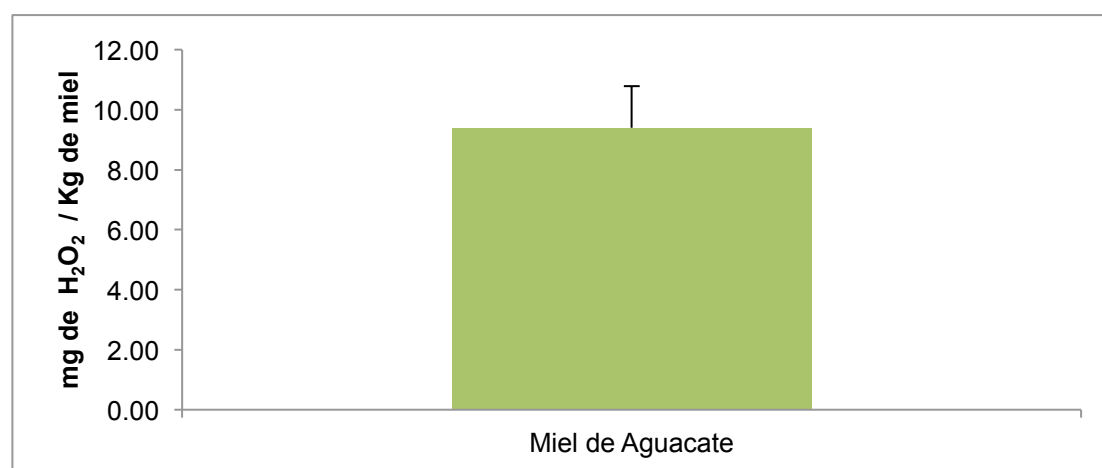


Figura 7. Contenido total de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en la muestra de miel de aguacate.

Todas las células del cuerpo producen energía mediante la oxidación de la glucosa.

La generación de peróxido de hidrógeno en la miel es el resultado de la oxidación de la glucosa, que es catalizada por la glucosa oxidasa (GOX) que proviene de las glándulas hipofaríngeas de las abejas (Gauhe, 1940), que luego se agrega al néctar por las abejas (Kwakman y Zaat, 2012).

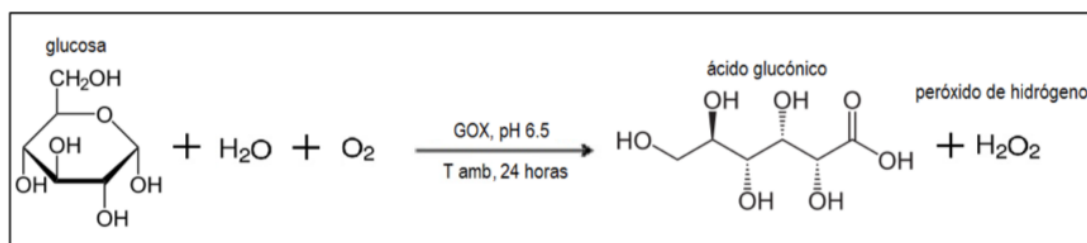


Figura 8. Esquema de reacción de oxidación de la glucosa catalizada por la enzima glucosa oxidasa. Tomado de Sanhueza, 2016.

La actividad antibacteriana de la mayoría de las mieles parece ser principalmente el resultado del peróxido de hidrógeno que se produce por la acción de la glucosa oxidasa en la miel (Bang et al., 2003).

Sin embargo, la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la miel depende de varios factores que tienen un impacto en la producción o neutralización de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como aquellos que pueden afectar la actividad de GOX (temperatura, origen floral y salud de las abejas) (Alaux et al., 2010) y catalasa derivada de polen que hidroliza eficazmente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en oxígeno y agua, que se consideran un potente bloqueador de la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Weston, 2000).

El peróxido de hidrógeno es un agente antimicrobiano eficaz si está presente a una concentración suficientemente alta. La aceleración del proceso de curación observado cuando la miel se usa como cubrimiento en las heridas también puede ser el resultado del peróxido de hidrógeno producido en la miel (Bang et al., 2003).

La miel de aguacate fue más efectiva en la inhibición de la formación de biopelículas que en la eliminación de biopelículas preformadas en *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* (Figuras 9 y 10). La miel de aguacate (20% w/v) fue más eficiente en la inhibición de la formación de la biopelícula, comparándolo con la solución de miel artificial.

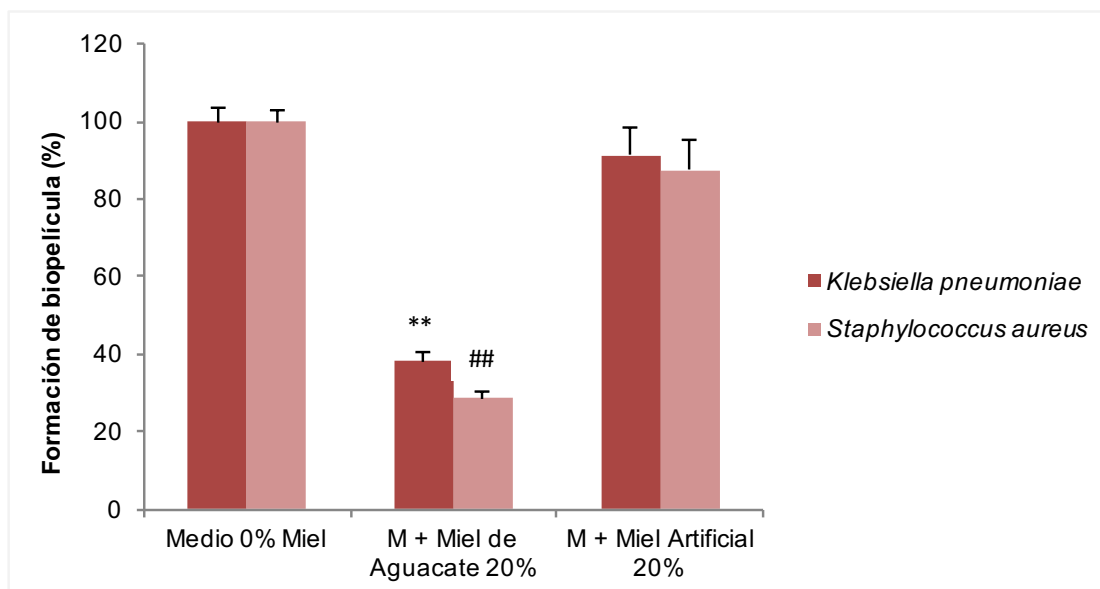


Figura 9. La miel de aguacate al 20% en comparación a la solución de miel artificial al 20%, resultó más eficaz para inhibir la generación del biofilm preformado.

La miel de aguacate (20% w/v) fue más eficiente en la eliminación de la biopelícula preformada en contraste con la solución de prueba de miel artificial.

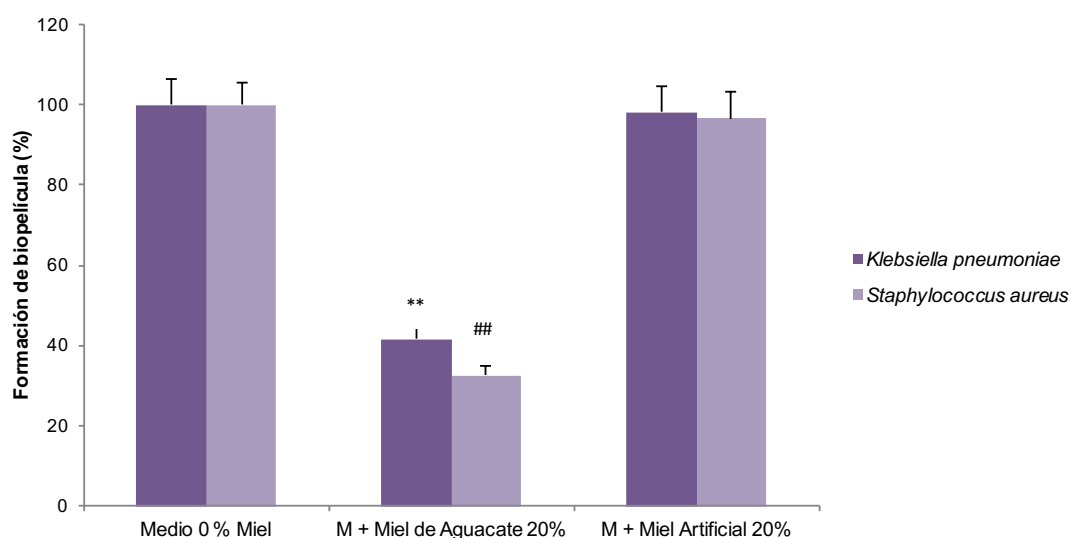


Figura 10. Eficiencia de la miel de aguacate para eliminar la biopelícula comparada con la solución al 20% de miel artificial.

Tanto en la Figura 9 y 10, la columna que pertenece al mismo conjunto de datos con diferentes símbolos son significativamente diferentes en comparación con (Medio 0% de miel). \*\*  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ .

La capacidad de la miel para afectar la biopelícula bacteriana se ha informado anteriormente (Lu et al., 2014, Majtan et al., 2014) e incluso se ha relacionado con su origen floral (Scepankova et al., 2017). La eficacia de la miel de aguacate contra la biopelícula bacteriana no se informa adecuadamente, por lo que el resultado expuesto representa el primer informe en este tipo de miel. Como se mencionó anteriormente, se considera que el peróxido de hidrógeno es en gran parte responsable de las propiedades antimicrobianas de la miel (Kwakman y Zaat, 2012); sin embargo, otros compuestos como los polifenoles también se han relacionado con esta propiedad biológica (Jagani et al., 2009).

Hay varios informes que indican que las tasas de producción de peróxido de hidrógeno en miel pueden variar mucho (White et al., 1963; White y Subers, 1963), ya que aumenta desproporcionadamente con diferentes grados de dilución de miel. Además, las diferentes heridas tienen diferentes cantidades de exudados. Por lo tanto, la miel aplicada a las heridas se diluye en diferentes grados, dando como resultado niveles variados de producción de peróxido de hidrógeno. Por lo tanto, es crucial saber más sobre la tasa de producción de peróxido de hidrógeno a medida que la miel se diluye, de modo que se pueda lograr un nivel apropiado de peróxido de hidrógeno en una herida (Bang et al., 2003).

La miel de aguacate mostró valores altos de peróxido de hidrógeno, por lo tanto, estos resultados podrían servir para justificar, en parte, la alta capacidad antimicrobiana encontrada en esta miel monofloral; sin embargo, otras pruebas son necesarias para confirmar esta afirmación.

## 5. CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

Los microorganismos patógenos que crecen en una biopelícula resultan ser más resistentes a los antibióticos que las planctónicas, lo cual resulta en que el tratamiento con antimicrobianos de las superficies contaminadas por biopelículas pueda fracasar. Por ello, la mejor propuesta es lograr la prevención de la formación de la biopelícula en lugar de eliminar la biopelícula preformada. Asimismo, al usar durante tiempos extendidos concentraciones altas de agentes antimicrobianos el resultado que se obtendrá es causar una resistencia. Existen productos naturales que son reconocidos por sus propiedades antibióticas, razón por la que se planteó en este estudio la hipótesis de que las características antimicrobianas de la miel de abeja consiguen asistir en la reducción de la formación de la biopelícula. En el estudio, la miel de aguacate resultó ser más eficaz para inhibir la formación de biopelículas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* que en su eliminación, hallazgo que favorece para luchar contra la bioresistencia.

La miel de abeja tiene una gama amplia de propiedades, siendo estas nutritivas o curativas, entre las cuales dentro del campo de la medicina se le atribuye la capacidad de curar heridas. Esto está dado por su actividad antimicrobiana, que resulta de la composición química de la miel, siendo los compuestos polifenólicos uno de los factores más importantes para combatir las infecciones causadas por bacterias.

De acuerdo al análisis fisicoquímico realizado en la miel de aguacate en estudio, los parámetros se encontraron de acuerdo con los estándares internacionales indicados, salvo algunas excepciones, sin embargo, los resultados concuerdan con datos disponibles en la literatura sobre este mismo tipo de miel monofloral. La miel de aguacate estudiada se caracteriza por su acidez, alto contenido de cenizas y conductividad eléctrica y, según el análisis de color que la clasifica como una miel muy oscura (ámbar oscuro),

que se da por su alta cantidad de elementos minerales. Debido a estos constituyentes fitoquímicos se establece que posee una actividad antibacteriana no peróxida ( $H_2O_2$ ) estable que le permite actuar como agente antimicrobiano.

Con los hallazgos reportados en este estudio, junto con los estudios previos realizados en el tema, exponen las propiedades de la miel y brindan una opción para proponer a la miel de aguacate como un antiséptico eficaz para el tratamiento tópico heridas infectadas de interés veterinario, con actividad antimicrobiana de amplio espectro, para con esto lograr reducir el uso indiscriminado de antibióticos y los fenómenos de resistencia.

Los patógenos en estudio (*Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*) presentan una alta versatilidad en términos de infecciones causadas y huéspedes a los que afectan, siendo una amenaza para la salud animal, la seguridad alimentaria y, en consecuencia, para la salud humana.

Con los resultados expuestos, la miel puede reducir la biopelícula y también eliminar las células que permanecen incrustadas en la matriz de biopelícula.

## **5.2. Recomendaciones**

Ya que el estudio fue realizado *in vitro*, sería una propuesta interesante corroborar los resultados obtenidos con pruebas *in vivo* para comprobar que, si se utiliza en un nivel terapéutico apropiado, la miel de aguacate se puede utilizar para prevenir e inhibir la formación de biopelículas en heridas crónicas, apoyando el uso de esta miel como un tratamiento tópico efectivo que podrían usarse en la práctica clínica contra el tipo de cepas utilizadas dentro de esta investigación.

Debido que la miel de aguacate utilizada en el estudio es producida en el Ecuador, es posible que existan más fuentes valiosas de miel de distinto origen floral dentro de la región Andina y en otras zonas del país, lo que se convierte en una oportunidad para los apicultores ecuatorianos para la generación de trabajo y rescatando a su vez los valores de la medicina tradicional.

Si es que se continúan con las investigaciones sobre los distintos tipos de miel producidas en el país junto con estudios en distintas cepas bacterianas formadoras de biopelículas, se incitará al uso de la miel *Apis mellifera* en la medicina convencional, ayudando a reducir la resistencia a los antibióticos, particularmente en el cuidado de las heridas e infecciones crónicas.



## REFERENCIAS

- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D. y Le Conte, Y. (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol. Lett.* 6, 562-565.
- Álvarez-Suarez J., Giampieri, F., Cordero. y Battino, M. (2013). Honey as a Source of Dietary Antioxidants: Structures, Bioavailability and Evidence of Protective Effects Against Human Chronic Diseases. *Current Medicinal Chemistry.* 20 (5), 621-38.
- Álvarez-Suarez, J.M., Giampieri, F., Brenciani, A., Mazzoni, L., Gasparini, M., González-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C., Morroni, G., Simoni, S., Forbes-Hernández, T.Y., Afrin, S., Giovanetti, y E.; Battino, M.(2018). *Apis mellifera* vs *Melipona beecheii* Cuban polyfloral honeys: A comparison based on their physicochemical parameters, chemical composition and biological properties. *LWT - Food Sci. Technol.* 87, 272-279.
- Bang, L., M.Phil., Bunting, C. y Molan, P. (2003). The Effect of Dilution on the Rate of Hydrogen Peroxide Production in Honey and Its Implications for Wound Healing. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine.* 9 (2), 267–273.
- Bentabol Manzanares, A., Hernández García, Z., Rodríguez Galdón, B., Rodríguez Rodríguez, E. y Díaz Romero, C. (2014). Physicochemical characteristics of minor monofloral honeys from Tenerife, Spain. *LWT - Food Science and Technology.* 55, 572-578.
- Boukraâ, L. (2014). *Honey in Traditional and Modern Medicine.* (1era. ed). Boca Ratón, FL: Taylor & Francis Group LLC.
- Bradbear, N. (2005). *La apicultura y los medios de vida sostenibles.* Recuperado el 24 de marzo del 2017 de <http://www.fao.org/docrep/008/y5110s/y5110s0a.htm#bm10>
- Burdon, H. (1995). Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med.* 18 (4), 775-794.
- Cabrera, J. (2016). *Apicultura y Apiterapia.* Recuperado el 9 de abril del 2017 de <http://apiterapia.com.ec/portal/apiterapia/miel>
- Chamani, G., Zarei, M., Mehrabani, M., Mahdavinezhad, A., Vahabian, M y Ahmadi-Motamayel, F. (March, 2017). Evaluation of Honey as a

- Topical Therapy for Intraoral Wound Healing in Rats. *WOUNDS Magazine*. 29 (3), 80-86.
- Chirife, J., Zamora, M. y Motto, A. (2006). The correlation between water activity and % moisture in honey: Fundamental aspects and application to Argentine honeys. *Journal of Food Engineering*. 72, 287-292.
- Cokcetin, N., Pappalardo, M., Campbell, L., Brooks, P., Carter, D., Blair, S. y Harry, E. (2016). The Antibacterial Activity of Australian *Leptospermum* Honey Correlates with Methylglyoxal Levels. *PLoS ONE*, 11 (12): e0167780. doi:10.1371/journal.pone.0167780
- Cooper, R y Jenkins, L. (February, 2009). A Comparison Between Medical Grade Honey and Table honeys in Relation to Antimicrobial Efficacy. *WOUNDS Magazine*. 21 (2), 29-36.
- Cooper, R., Jenkins, L. y Rowlands, R. (2011). Inhibition of biofilms through the use of manuka honey. *Wounds UK*. 7 (1), 24-32.
- Cooper, R., Molan, P. y Harding, K. (2002). The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *Journal of Applied Microbiology*. 93, 857–863.
- Costerton, J., Stewart, P. y Greenberg, E. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*. 284 (5418), 1318-1322.
- Davidenko, A. (2015). *Conversión de néctar en las abejas de miel*. Recuperado el 11 de abril del 2017 de <https://es.dreamstime.com/fotograf%C3%ADa-de-archivo-libre-de-regal%C3%ADas-el-proceso-de-convertir-el-n%C3%A9ctar-la-miel-image20696877>
- de Almeida-Muradian, L., Stramm, K., Horita, A., Barth, O., da Silva, A., y Estevinho, L. (2013). Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*. *International Journal of Food Science and Technology*. 48, 1698–1706.
- Delmoro, J., Muñoz, D., Nadal, V., Clementz, A. y Pranzetti, V. (2010). El color en los alimentos: determinación de color en mieles. *Invenio*. 13 (25), 145-152.

- El-Aidy, W., Ebeid, A., Sallam, A., Muhammad, I., Abbas, A., Kamal, A. y Sartaj, S. (2015). Evaluation of propolis, honey, and royal jelly in amelioration of peripheral blood leukocytes and lung inflammation in mouse conalbumin-induced asthma model. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 22, 780-788.
- Estevinho, L., Pereira, A., Moreira, L., Dias, L. y Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*. 46, 3774–3779.
- Fallico, B., Arena, E., Verzera, A. y Zappala, M. (2006). The European Food Legislation and its impact on honey sector. *Accred Qual Assur*. 11, 49-54.
- Ferreira, I., Aires, E., Barreira, J. y Estevinho, L. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*. 114 (4), 1438–1443.
- Fossum, T. (2009). *Cirugía en pequeños animales*. (3era. ed). Barcelona, España: Editorial Elsevier España S.L.
- Gauhe, A. (1940). Über ein ghtkoseoxydierendes Enzyme in der Pharynxdrüse der Honigbiene. *Z. uergi. Physiol*. 28, 211-253.
- Gomes, S., Dias, L., Moreira, L., Rodrigues, P. y Estevinho, L. (2010). Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 48, 544-548.
- González-Miret, M., Terrab, A., Hernanz, D., Fernández-Recamales, M. y Heredia, J. (2005). Multivariate Correlation between Color and Mineral Composition of Honeys and by Their Botanical Origin. *J. Agric. Food Chem*. 53, 2574-2580.
- Hadorn, H. (1961). *Mitt Gebiete Lebens u Hyg* , 52, 67.
- Hammond, E., Donkor, E. y Brown, C. (2014). Biofilm formation of *Clostridium difficile* and susceptibility to Manuka Honey. *Complementary and Alternative Medicine*. 14 (329).
- Jagani, S., Chelikani, R. y Kim, D. (2009). Effects of phenol and natural phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling*. 25, 321-324.

- Jean-Prost, P. y Le Conte, Y. (2007). *Apicultura: conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena*. (4ta. ed). Madrid, España: Ediciones Mundi-Presa.
- Jiang, Z., Hunt, J. y Wolff, S. (1992). Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*. 202 (2), 384-389.
- Känzig, A., Kaufmann, D. y Bogdanov, S. (2001). *Stability of Hydroxymethylfurfural during Determination by HPLC*. Recuperado el 17 de noviembre del 2017 de <http://www.ihc-platform.net/kaenzig2001.pdf>
- Khalil, A., Khan, I., Ahmad, K., Khan, Y., Khan, J. y Shinwari, Z. (2014). Antibacterial activity of honey in north-west Pakistan against select human pathogens. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 34 (1), 86-89.
- Kwakman, P. y Zaat, S. (2012). Antibacterial Components of Honey. *IUBMB Life*. 64 (1), 48-55.
- Lasa, Í. (2004). Biofilms bacterianos. *Boletín Informativo de la Sociedad Española de Microbiología*. 37 (1), 14-18.
- Louveaux, J., Maurizio, A. y Vorwohl, G. (1970). Methods of Melissopalynology. *Bee World*. 51 (3), 125-138.
- Lu, J., Turnbull, L., Burke, C., Liu, M., Carter, D., Schlothauer, R., Whitchurch, C. y Harry, E. (2014). Manuka-type honeys can eradicate biofilms produced by *Staphylococcus aureus* strains with different biofilm-forming abilities. *Published online 2014 Mar 25. doi: 10.7717/peerj.326*
- MAGAP. (2014). *Ecuador tiene potencial para la apicultura*. Recuperado el 14 de abril del 2017 de <http://www.agricultura.gob.ec/ecuador-tiene-potencial-para-la-apicultura/>
- MAGAP. (2016). *Informe del plan de intervención para el control de varroosis en las zonas de mayor prevalencia en el Ecuador*. Recuperado el 14 de abril del 2017 de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2016/09/SA-CZ-PAP-D2-Plan-de-Intervencion-para-el-Control-de-la-Varroosis.pdf>
- Mah, T. y O'Toole, G. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *TRENDS in Microbiology*. 9 (1), 34-39.

- Majtan, J., Bohova, J., Prochazka, E. y Klaudiny, J. (2014). Methylglyoxal may affect hydrogen peroxide accumulation in manuka honey through the inhibition of glucose oxidase. *J Med Food*. 17 (2), 290-293.
- Mandal, M. y Mandal, S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1 (2), 154-160.
- McLoone, P., Warnock, M., y Fyfe, L. (2016). Honey: A realistic antimicrobial for disorders of the skin. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 46, 161-167.
- McVey, D., Kennedy, M. y Chengappa, M. (2013). *Veterinary Microbiology*. (3era. ed). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Méndez, K., López, E. y Portilla, M. (2011). Estudio comparativo de las propiedades fisicoquímicas de miel natural y miel sometida a proceso comercial. *Revista @limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 9 (1), 14-21.
- Mendizabal, F. (2005). *Abejas*. (1era. ed). Buenos Aires, Argentina: Editorial Albatros.
- Meo, S., Al-Asiri, S., Mahesar, A. y Ansar M. (2017). Role of honey in modern medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.010>
- Molan, P. y Rhodes, T. (June, 2015). Honey: A Biologic Wound Dressing. *WOUNDS Magazine*. 27 (6), 141-151.
- Montoya-Pfeiffer, P., León-Bonilla, D. y Nates-Parra, G. (2014). Catálogo de polen en mieles de *Apis mellifera* provenientes de zonas cafeteras en la Sierra Nevada de Santa Marta, Magdalena, Colombia. *Complementary and Alternative Medicine Rev. Acad. Colomb. Cienc*. 38 (149), 364-384.
- Muñoz, O., Copajal, S., Speiskyll, H., Peñalill R., y Montenegro, G. (2007). Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. *Quím. Nova*. 30 (4), 848-851.
- National Honey Board. (2016). *Honey Varietals*. Recuperado el 11 de abril del 2017 de <https://www.honey.com/honey-at-home/learn-about-honey/honey-varietals>

- Normex. (2000). *Norma mexicana de miel; Alimentos-miel-especificaciones y metodos de prueba*. Recuperado el 31 de noviembre del 2017 de <http://www.anmvea.com/wp-content/uploads/2017/09/NMX-F-036-1997.pdf>
- Persano Oddoa, L., Pianaa, L., Bogdanovb, S., Bentabolc, A., Gotsioud, P., Kerkvliete, J., Martinf, P., Morlotg, M., Ortiz Valbuenah, A., Ruoffb K. y von der Ohej, K. (2004). Botanical species giving unifloral honey in Europe. *Apidologie*. 35, S82 - S93.
- Peton, V. y Le Loir, Y. (2014). Staphylococcus aureus in veterinary medicine. *Infection, Genetics and Evolution*. 21, 602-615.
- Ratia, M. (2006). *Apicultura en los Andes - Problemática y posibilidades entre Perú, Ecuador y Bolivia*. Recuperado el 7 de abril del 2017 de <http://www.apiservices.biz/es/articulos/ordenar-por-popularidad/756-apicultura-en-los-andes>
- Rahman, M., Gan, S. y Khalil, I. (April, 2014). Neurological Effects of Honey: Current and Future Prospects. *Evidence-based. Complementary and Alternative Medicine*. Volume 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/958721>
- Reyes, J. (2012). *Fundamentos científicos de la apiterapia la miel de abeja y el propóleo*. Recuperado el 14 de abril del 2017 de <http://www.anmvea.com/imagenes/congresos/MemoriasCongresos/MC IAA19.pdf#page=72>
- Roberts, D., McClain, H., Hansen, D., Currin, P. y Howerth, E. (2000). An outbreak of *Klebsiella pneumoniae* infection in dogs with severe enteritis and septicemia. *J Vet Diagn Invest*. 12, 168-173.
- Sanhueza, O. (2016). *Caracterización química multifactorial de miel en relación a la infección por Nosema ceranae en abejas, actividad antimicrobiana y origen geográfico del producto*. Santiago de Chile, Chile. Universidad de Chile. Recuperado el 29 de noviembre del 2017 de <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/141628/Caracterizacio-n-quimica-multifactorial-de-miel-en-relacion-a-la-infeccion-por-Nosema.pdf?sequence=1>

- Sanz, S. y Sanz, M. (1994). Humedad, cenizas y conductividad eléctrica en mieles de La Rioja. *ZUBÍA*. 12, 143-158.
- Scepankova, H., Saraiva, J. y Estevinho, L. (2017). *Bee Products - Chemical and Biological Properties*. Honey Health Benefits and Uses in Medicine. Ed. Springer International Publishing.
- Schade, E., Marsh, L. y Eckert, E. (1958). Diastase activity and hydroxymethylfurfural in honey and their usefulness in detecting heat adulteration. *Food Research*. 23, 446-4463.
- Songer, J. y Post, K. (2004). *Veterinary Microbiology*. (1era. ed). USA: Elsevier Health Sciences.
- Terrab, A., y Heredia, F. (2004). Characterization of avocado (*Persea americana* Mill) honeys by their physicochemical characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1801-1805.
- The Council of the European Union (2002). Council Directive 2001/ 110/ec of 20 December 2001 relating to honey. Official Journal of the European Communities, L10, pp. 47–52.
- Tur, E., Bolton, L. y Constantine, B. (1995). Topical hydrogen peroxide treatment of ischemic ulcers in the guinea pig: blood recruitment in multiple skin sites. *J Am Acad Dermatol*. 33 (2 Pt 1), 217-221.
- Valega, O. (2005). *Todo sobre la miel*. Recuperado el 11 de abril del 2017 de <http://www.apiservices.biz/es/articulos/ordenar-por-popularidad/938-todo-sobre-la-miel>
- Vela, L., de Lorenzo, C. y Pérez, A. (2007). Antioxidant capacity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and other physicochemical properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87, 1069-1075.
- Velasco, M. y Yamasaki, A. (2002). Bacterias de interés veterinario. *Med Vet*. 19 (10), 1-11.
- Villamizar, I. (2015). Biofilm: importancia en la práctica veterinaria. *Veterinaria (Montevideo)*. 51 (197), 36-41.
- Von Der Ohea, W., Oddob, L., Pianab, M., Morlotc, M. y Martin, P. (2004). Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*. 35 , S18–S25.
- Watnick, P. y Kolter, R. (2000). Biofilm, City of Microbes. *Journal Of Bacteriology*. 182 (10), 2675-2679.

- Weese, J. y van Duijkeren, E. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*. 140, 418-429.
- Weston, R. (2000). The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry*. 71, 235-239.
- White, W. y Pairent, W. (1959). *J.A.O.A.C.* 42, 344.
- White W. y Subers M. (1963). Studies on honey Inhibine. 2. A chemical assay. *J Apic Res.* 2. 93–100.
- White W., Subers M. y Schepartz A. (1963). The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose–oxidase system. *Biochim Biophys Acta*. 73. 57–70.



## **ANEXOS**

**Anexo 1. Parámetros que las mieles deben cumplir para asegurar su calidad.**

**Adaptado de The Council of the European Union, 2002.**

**Contenido de azúcar**

**1. Contenido de fructosa y glucosa (suma de ambos)**

miel de flores no menos de 60 g/100 g

miel de mielada, mezclas de miel de mielada con miel de flor no menos de 45 g / 100 g

**2. Contenido de sacarosa**

en general no más de 5 g/100 g

falsa acasia (*Robinia pseudoacacia*), alfalfa no más de 10 g/100 g

(*Medicago sativa*), Banksia de Menzies (*Banksia menziesii*), Sulla (*Hedysarum*), Eucalipto rojo (*Eucalyptus camaldulensis*), *Eucryphia lucida*, *Eucryphia milliganii*, *Citrus* spp.

lavanda (*Lavandula* spp.), borraja (*Borago officinalis*) no más de 15 g/100 g

**Contenido de humedad**

en general no más de 20%

miel de breso (*Calluna*) y miel para uso industrial no más del 23%

miel de breso (*Calluna*) para uso industrial no más del 25%

**Contenido de sólidos insolubles en agua**

en general no más de 0,1 g/ 100 g

miel prensada no más de 0,5 g/100 g

**Conductividad eléctrica**

miel en general y mezclas de estas no más de 0,8 mS/cm

miel de mielada, miel de castaño y mezclas de las mismas excepto con las mieles que se enumeran a continuación: madroño (*Arbustus unedo*), argaña (*Erica*), eucalipto, tilo (*Tilia*

spp.), brezo (*Calluna vulgaris*), (*Leptospermum*),  
árbol del té (*Melaleuca* spp.)

---

### Ácidos libres

---

en general	no más de 50 meq/Kg
------------	---------------------

---

miel para uso industrial	no más de 80 meq/Kg
--------------------------	---------------------

---

### Actividad de diastasa y contenido de hidroximetilfurfural (HMF)

#### determinado después del procesamiento y la mezcla

---

#### 1. Actividad de diastasa (escala de Schade)

---

en general, excepto para mieles de uso industrial	no menos de 8
---	---------------

---

mieles con un contenido bajo de enzimas naturales (por ejemplo, mieles de cítricos) y un contenido de HMF no superior a 15 mg/Kg	no menos de 3
--	---------------

---

#### 2. HMF

---

en general, excepto para mieles de uso industrial	no más de 40 mg/Kg
---	--------------------

---

miel de origen declarado procedente de regiones de clima tropical y mezclas de estas mieles	no más de 80 mg/Kg
---	--------------------

## Anexo 2. Especificaciones físicoquímicas de la miel.

Tomado de la Norma Mexicana NMX-F-036-1997-NORMEX (2000).

Especificaciones	Mínimo	Máximo
Contenido aparente de azúcar reductor expresado como % (g/100g) de azúcar invertido.	63.88	–
Contenido de sacarosa % (g/100g).	–	5.00
Contenido glucosa % (g/100g).	–	38.00
Humedad % (g/100g)	–	20.00
Sólidos insolubles en agua % (g/100g)	–	0.30
Cenizas % (g/100g)	–	0.60
Acidez expresada como miliequivalentes de ácido/kg.	–	40.00
Hidrometilfurfural (HMF), expresado en mg/kg en miel envasada. De más de 6 meses.	–	80.00
Hidrometilfurfural (HMF), expresado en mg/kg en miel envasada. De menos de 6 meses.	–	40.00
Índice de diastasa.	–	8.0 *

\* Para las mieles con bajo contenido enzimático, el índice mínimo de diastasa en la escala de Gothe será de 3.0 siempre y cuando no exceda en el contenido en HMF de 15 mg/kg.

### Anexo 3. Determinación de acidez.

$$\text{Acidez libre} = \frac{(\text{ml de hidróxido de sodio } 0.05 \text{ N de la muestra}) - (\text{ml de hidróxido de sodio del blanco}) \times 50}{(\text{g de muestra})}$$

$$\text{Lactona} = \frac{(10 - \text{ml de ácido clorhídico o } 0.05 \text{ N}) \times 50}{(\text{g de muestra})}$$

$$\text{Acidez Total} = \text{Acidez Libre} + \text{Lactona}$$

### Anexo 4. Determinación de la actividad de la diastasa.

Representar gráficamente la absorbancia en función del tiempo (minutos) sobre un papel cuadriculado. Trazar una línea recta que una por lo menos los tres últimos puntos de la gráfica, para determinar el momento en que la mezcla de reacción alcanza la absorbancia de 0.235. Dividir 300 por el tiempo en minutos para obtener el índice de diastasa (ID). Este índice expresa la actividad de la diastasa en mililitros de solución al 1 por ciento hidrolizada por la enzima contenida en 1g de miel, en 1 hora, a 40°C. este índice de diastasa corresponde al índice de la escala de Gothe. (Norma Mexicana NMX-F-036-1997-NORMEX (2000)).

$$\text{Actividad de la diastasa} = \frac{\text{mililitros de solución de almidón (1\%)}}{\text{gramos de miel/hora}} \text{ a } 40^{\circ}\text{C}$$

## Anexo 5. Determinación de Hidroximetilfurfural (HMF).

Cuando lo que se desea determinar es el hidrometilfurfural, *no se debe calentar la miel*.

$$\text{mg} \frac{\text{HMF}}{100} \text{ g miel} =$$

$$\frac{(\text{Absorbancia de la muestra 284 nm} - \text{Absorbancia de la muestra 336 nm}) \times 14.97 \times 5}{(\text{g de la muestra})}$$

Donde: 14,97 es el factor = (126/16,830) (1000/10)(100/5)

126= peso molecular del HMF

16,830= absortilidad molar del HMF a 284 nm

1000= mg/g

10= centilitros por litro

100= gramos de miel reportados

5= peso nominal de la muestra en gramos

## Anexo 6. Determinación de cenizas.

$$\% \text{ sólidos de cenizas} = \frac{\text{peso de cenizas}}{\text{peso de muestra}} \times 100$$

