



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO TÉRMICO EN LA CAPACIDAD
ANTIMICROBIANA DE LA MIEL DE EUCALIPTO DE LA PROVINCIA DE
PICHINCHA-ECUADOR

AUTOR

Adrián Alexander Proaño Artieda

AÑO

2020



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO TÉRMICO EN LA CAPACIDAD
ANTIMICROBIANA DE LA MIEL DE EUCALIPTO DE LA PROVINCIA DE
PICHINCHA-ECUADOR

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología.

Profesor Guía:

PhD José Miguel Álvarez Suárez

Autor

Adrián Alexander Proaño Artieda

Año

2020

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Influencia del tratamiento térmico en la capacidad antimicrobiana de la miel de eucalipto de la provincia de Pichincha-Ecuador, a través de reuniones periódicas con el estudiante Adrián Alexander Proaño Artieda, en el semestre 202010, 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".



José Miguel Álvarez Suárez
Doctor en Alimentación y Salud
CI: 1756653372

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

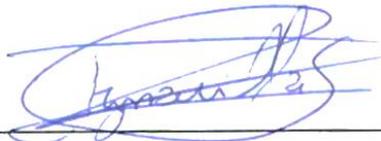
“Declaro haber revisado este trabajo, Influencia del tratamiento térmico en la capacidad antimicrobiana de la miel de eucalipto de la provincia de Pichincha-Ecuador, del estudiante Adrián Alexander Proaño Artieda, en el semestre 202010, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Isabel Ballesteros Redondo', written over a horizontal line.

María Isabel Ballesteros Redondo
Doctora en Biología con mención en Genética
CI: 1757168610

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante Adrián Alexander Proaño Artieda para la realización de su trabajo experimental de titulación, Influencia del tratamiento térmico en la capacidad antimicrobiana de la miel de eucalipto de la provincia de Pichincha-Ecuador, en el semestre 202010, en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Irina Villacrés', is written over a horizontal line.

Irina Maribel Villacrés Granda
Master en Enfermedades Infecciosas
CI: 1716866064

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”.



Adrián Alexander Proaño Artieda

CI: 1715922488

AGRADECIMIENTOS

Al PhD José Miguel Álvarez, por su apoyo, confianza, guía y ejemplo de determinación. A la MSc. Irina Villacrés PhD(c) por sus incontables enseñanzas, su calidez humana y ejemplo de excelencia, por ser la mejor maestra de todas. A la PhD Isabel Ballesteros por su buena voluntad y paciencia. A la MBA Genoveva Granda, al Ing. Byron Freire, al Ing. Christian Bilbao y a todo el personal que conforma los Laboratorios de Investigación de la UDLA. A la MSc. Emilia Vásquez y la MSc. Gabriela Granja por su amable orientación durante toda la carrera.

DEDICATORIA

Para Shaya, por cada instante y cada momento, por su amor constante y su apoyo infinito.

Para May, Jhonattan, Paul y Pame, por siempre darme ánimo en los momentos más difíciles y ayudarme en tantas cosas.

Para mi hermano Emilio, mi madre Eli, mi padre Ramiro, mi abuela Gladys, mi tía Flora, mi tío Boa y mi tía Xime, por sus diferentes y grandes maneras de apoyarme.

Para David y Francisco, por sus tardes y su dedicación.

RESUMEN

La miel de eucalipto tiene actividad antimicrobiana y puede ser una solución frente a la creciente resistencia a antibióticos desarrollada por los microorganismos patógenos actuales. Debido a la ubicación geográfica de donde se produce la miel en el país, se genera un efecto de cristalización que no es deseado por los consumidores, esto ocasiona que los productores sometan a la miel a procesos de calentamiento no estandarizados, que pueden afectar sus propiedades antimicrobianas. El propósito de éste estudio fue determinar un tratamiento térmico adecuado que evite la cristalización de la miel y reduzca al máximo la pérdida de propiedades antimicrobianas, además de comparar su efecto aplicándola a diferentes concentraciones sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* en experimentos de inhibición de formación de biopelículas y rompimiento de biopelículas preformadas. Se realizó un análisis polínico de 30 muestras de miel de eucalipto obtenidas directamente de los apicultores de diversos cantones de la provincia de Pichincha, que se utilizaron para realizar ensayos de actividad antimicrobiana mediante mediciones de absorbancia por espectrofotometría, posteriormente, se determinó las diferencias significativas para los porcentajes de actividad antimicrobiana entre todos los tratamientos mediante un ANOVA con una corrección de Bonferroni para la comparación múltiple entre las muestras. Se pudo confirmar un origen floral correspondiente a eucalipto y observar que para las mieles sin tratamiento térmico existe una diferencia bastante significativa respecto a un tratamiento control, esto confirmó la capacidad antimicrobiana de la miel de eucalipto. También, se pudo apreciar que el tratamiento a 45°C generó una pérdida prominente en los porcentajes de actividad antimicrobiana mientras que el tratamiento térmico a 60°C mostró una reducción leve en estos valores. Además, se pudo observar que la miel es más efectiva sobre bacterias Gram positivas y que tiene mayor actividad en experimentos de inhibición de biopelículas. Se puede concluir que la temperatura puede afectar de manera positiva o negativa la

respuesta antimicrobiana de la miel y que el tratamiento térmico a 60°C podría ser una alternativa para evitar el efecto de cristalización en la miel y no perder totalmente sus propiedades de actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

Eucalyptus honey has antimicrobial activity and may be a solution to the increasing resistance to antibiotics developed by current pathogenic microorganisms. Due to the geographical location of where honey is produced in the country, a crystallization effect is generated which is not desired by consumers, this causes honey producers to make non-standardized heating processes that affect their antimicrobial properties. The purpose of this study was to determine an appropriate heat treatment that prevents the crystallization of honey and minimizes the loss of antimicrobial properties. In addition, we compared its effect by applying different concentrations on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in inhibition of biofilm formation experiments and breaking of preformed biofilms. A polinical analysis of 30 samples of eucalyptus honey that was obtained directly from beekeepers in various cantons of the province of Pichincha was carried out. Samples were used to perform tests of antimicrobial activity by absorbance measurements by spectrophotometry, subsequently, the differences were determined by the percentages values of antimicrobial activity among all treatments using an ANOVA with a Bonferroni correction for multiple comparison between samples. It was possible to confirm a floral origin corresponding to Eucalyptus. Assays demonstrated that honey without heat treatment has a quite significant difference with respect to a treatment control; this confirms the antimicrobial capacity of eucalyptus honey. Also, it was achieved that the treatment at 45 °C generated a prominent loss in the percentages of antimicrobial activity while the heat treatment at 60 °C showed a slight reduction in these values. In addition, it was observed that honey is more effective on Gram-positive bacteria and that it has more activity in inhibition of biofilm formation experiments. It can be concluded that the temperature can positively or negatively affect the antimicrobial response of honey and that the thermal treatment at 60 °C could be an alternative to avoid the effect of crystallization in honey and not completely lose its antimicrobial activity properties.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Antecedentes	1
1.2.	Planteamiento del problema	6
1.3.	Objetivo general	8
1.4.	Objetivos específicos.....	8
1.5.	Justificación de la investigación.....	9
2.	MARCO TEÓRICO	10
2.1.	Miel	10
2.1.1.	Usos históricos.....	10
2.1.2.	Propiedades antimicrobianas.....	11
2.1.3.	Cristalización.....	13
2.1.4.	Productores, comercialización y tratamientos térmicos	14
2.2.	Biopelículas.....	14
2.2.1.	Adherencia.....	15
2.2.2.	Viscoelasticidad	15
2.2.3.	Matriz de sustancia polimérica extracelular (EPS).....	16

2.2.4.	Arquitectura.....	16
2.2.5.	Fases de crecimiento.....	16
2.3.	Microorganismos.....	17
2.3.1.	Pseudomonas aeruginosa.....	17
2.3.2.	Staphylococcus aureus.....	18
2.4.	Fundamentos técnicos.....	20
2.4.1.	Cultivo de microorganismos.....	20
2.4.2.	Caldo de cultivo BD <i>Tryptic Soy Broth (TSB)</i>	21
2.4.3.	Sustancias tampón.....	21
2.4.4.	Ensayos de inhibición de biopelículas y de destrucción de biopelículas preformadas.....	22
2.4.5.	Espectrofotometría.....	22
2.4.6.	Curvas de relación dosis respuesta.....	23
3.	PROCEDIMIENTOS.....	23
3.1.	Población y muestra.....	23
3.2.	Contenido polínico.....	24
3.3.	Preparación de las muestras de miel.....	24
3.4.	Cultivo de microorganismos.....	24
3.5.	Ensayos espectrofotométricos.....	25

3.5.1.	Destrucción de biopelículas preformadas	25
3.5.2.	Inhibición de biopelículas.....	27
3.5.3.	Análisis estadísticos de ensayos espectrofotométricos	28
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1.	Población y contenido polínico	28
4.2.	Actividad antimicrobiana.....	28
4.3.	Tratamientos térmicos	31
4.4.	Relación dosis - respuesta	33
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	35
5.1.	Conclusiones.....	35
5.2.	Recomendaciones.....	35
	REFERENCIAS.....	37
	ANEXOS	52

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La miel de abeja es una solución sobresaturada de azúcares producida por las abejas principalmente a partir de secreciones de plantas y néctar (Álvarez Suarez, 2017). Su composición es usualmente variable pero depende básicamente del recurso floral del que proviene y de factores geográficos y ambientales (Gheldof, Wang y Engeseth, 2002).

La miel ha sido reconocida en la medicina a lo largo de la historia por diversas culturas debido a sus propiedades curativas (Álvarez Suarez, Tulipani, Romandini, Bertoli y Battino, 2010). Se conoce que los antiguos griegos y egipcios la utilizaban en aplicaciones tópicas para tratar quemaduras y heridas cutáneas, y que los persas la utilizaban en el tratamiento de inflamaciones y eccemas (Eteraf-Oskouei y Najafi, 2013; Sepehr, 2010). En la actualidad, existen estudios *in vitro* que han demostrado el efecto de la miel para reducir la patogenicidad y revertir la resistencia a antibióticos de microorganismos causantes de problemas dermatológicos (McLoone, Warnock y Fyfe, 2016).

Muchas de las propiedades melíferas que promueven la inhibición o reducción del crecimiento bacteriano, especialmente en el caso de las mieles con un origen floral predominante, pueden ser asociadas a los componentes fitoquímicos del néctar producidos como una respuesta fisiológica de las plantas para favorecer procesos de crecimiento, nutrición y producción de defensas. Las plantas utilizan estos procesos para garantizar su supervivencia frente a cambios en el entorno (Grandis,

Godoi y Buckeridge, 2010; Pimentel, da Costa, Albuquerque y Junior, 2013). Existen numerosas investigaciones referentes a las propiedades antimicrobianas de miel originaria de distintos lugares y de sus aplicaciones farmacológicas contra diversos microorganismos (Chua, Lee y Chan, 2013). Se puede citar como ejemplo, a un estudio de la actividad antimicrobiana de mieles monoflorales provenientes de Cuba contra cepas de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, en el que se pudo observar mayor sensibilidad frente a la miel en bacterias Gram positivas que en bacterias Gram negativas (Álvarez-Suarez et al., 2010). Otro estudio realizado con mieles originarias de Brasil, reportó la presencia de actividad inhibitoria sobre el crecimiento de cepas de *E. coli*, *S. aureus* y *Proteus vulgaris* (Pimentel et al., 2013).

Dentro de las propiedades antimicrobianas de la miel, se incluye la capacidad para reducir e inhibir el crecimiento de biopelículas bacterianas. Las biopelículas representan un modo de crecimiento bacteriano protegido, que implica la formación de una matriz que se adhiere a superficies y que permite a las células microbianas sobrevivir en entornos hostiles (Sandrin, Dowd, Herman y Maier, 2009).

La formación de biopelículas es un ciclo sin fin, en el cual comunidades organizadas de bacterias se incluyen en una matriz extracelular de sustancias poliméricas que mantiene a las células microbianas juntas y adheridas a una superficie (Donlan, 2002; Karatan y Watnick, 2009). En el mundo microscópico, las biopelículas son consideradas metafóricamente como ciudades de microbios (Nikolaev y Plakunov, 2007; Watnick y Kolter, 2000). Las matrices de exopolisacáridos se componen principalmente de biomoléculas, ADN extracelular y polipéptidos que forman una mezcla polar altamente hidratada que contribuye a los andamios estructurales y a la arquitectura de la biopelícula (Branda, Vik, Friedman y Kolter, 2005; Flemming y

Wingender, 2010; Rasamiravaka, Labtani, Duez y Jaziri, 2015; Sutherland, 2001a, 2001b).

Muchas de las capas de las que se compone la biopelícula experimentan un contacto célula con célula, ya sea en la capa unida a la superficie, o en la capa que tiene contacto directo con el sustrato, o en flóculos, que son biopelículas móviles que se forman en la ausencia de sustratos. Las interacciones celulares, físicas y sociales, en conjunto con las propiedades de la matriz, implican que las biopelículas sean claramente un modo de vida distinto al de las células bacterianas de vida y movimiento libre (Flemming y Wingender, 2010) con propiedades distintas y no predecibles (Konopka, 2009).

Los microorganismos que forman parte de una comunidad de biopelículas obtienen grandes beneficios. La matriz fibrosa extracelular puede actuar como una resina de intercambio para filtrar y recolectar nutrientes esenciales, proteger a la comunidad de condiciones ambientales de estrés como deshidratación o cambios de pH y temperatura, e incluso, puede proveer protección a las células de predadores como protozoarios. Comparada con las células planctónicas, una estructura de biopelículas es mucho más resistente a sustancias antibacterianas como antibióticos y desinfectantes, la baja eficacia de estos agentes puede deberse a su incapacidad para penetrar en el material de la matriz extracelular o, a un estado fisiológico alterado de las células bacterianas adheridas (Ayres, Payne, Furr y Russell, 1998; De Beer, Srinivasan y Stewart, 1994; Nickel, Ruseska, Wright y Costerton, 1985; Pratt y Kolter, 1999; Sandrin et al., 2009; Vess, Anderson, Carr, Bond y Favero, 1993).

Este conjunto de características hacen que las biopelículas representen uno de los modos de vida más extensamente distribuidos y exitosos en la Tierra (Stoodley, Sauer, Davies y Costerton, 2002). Dos bacterias que tienen la capacidad de formar biopelículas y que son de gran importancia para la salud pública son *P. aeruginosa* y *S. aureus* (Moradali, Ghods y Rehm, 2017; Ozekinci et al., 2014).

Para poder tratar infecciones mediadas por biopelículas, se ha utilizado una amplia variedad de métodos y agentes antibacteriales, sin embargo, no se ha logrado una respuesta totalmente eficaz, por el contrario, se ha propiciado un desarrollo creciente de mecanismos de resistencia a antibióticos por parte de los microorganismos que se ha intentado erradicar (Hall-Stoodley, Costerton y Stoodley, 2004).

Entre las investigaciones realizadas, se ha evaluado la acción de germicidas como yodóforos, detergentes fenólicos, compuestos de amonio, formaldehído, glutaraldehido y etanol sobre biopelículas formadas por cepas de *P. aeruginosa*, *P. mesophilica* y *P. cepacia* inoculadas sobre superficies de plástico PVC. Se ha podido observar la adherencia y colonización de este tipo de superficie y además, el desarrollo de mecanismos de resistencia frente a los agentes antimicrobianos (Vess et al., 1993).

Estudios acerca de la acción de ciertas sustancias que son altamente efectivas frente a células en estado planctónico como la clorina frente a *P. aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* (De Beer et al., 1994) y de antibióticos aminoglucósidos de amplio espectro como tobramicina y amikacina, cefalosporinas de tercera generación como ceftazidima, tobramicina y betalactámicos como flucloxacilina contra a *P. aeruginosa* y *S. epidermidis* (Nickel et al., 1985; Vergères y Blaser, 1992)

han mostrado una acción menos efectiva al ser aplicados frente a biopelículas de las mismas cepas, que han podido mantener su viabilidad después de los tratamientos.

Se ha observado que la miel de abeja tiene la capacidad de recuperar y potenciar la actividad de agentes antimicrobianos para eliminar o impedir el crecimiento de microorganismos en estado de biopelículas, se puede citar como ejemplo, un estudio en el que se evaluó de manera exitosa la acción de antibióticos de la familia de glucopéptidos de estructura compleja como vancomicina y de betalactámicos como la ampicilina en conjunto con miel y se logró una disrupción en cepas de *S. aureus* (Zamora et al., 2017).

Además, se ha podido evidenciar la capacidad de la miel para reducir o inhibir por sí sola la formación de estas biopelículas bacterianas (Lu et al., 2014; Maddocks, Lopez, Rowlands y Cooper, 2012). Un estudio que corrobora este efecto, evaluó la acción de mieles provenientes de regiones muy diversas como África, Nueva Zelanda y Cuba, y obtuvo resultados similares en la disrupción de biopelículas (Morrone et al., 2018). En Ecuador, se ha evaluado esta propiedad para mieles monoflorales de aguacate, eucalipto y colza frente a cepas de *S. aureus* y *K. pneumoniae* (García-Tenesaca et al., 2017).

La miel de eucalipto ha sido significativamente importante a nivel comercial, principalmente por su aroma atractivo y por las propiedades medicinales de la planta de la que proviene (Barbosa, Filomeno y Teixeira, 2016). En Ecuador, de acuerdo con el Programa Nacional de salud y apicultura llevado a cabo por la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD), las actividades apícolas se concentran principalmente en las zonas altas de la región central norte, donde

abunda una gran diversidad floral que permite a las abejas utilizar diferentes floraciones a lo largo del año y producir una amplia variedad de mieles (Valdés-Silverio et al., 2018). Las extensas plantaciones de eucalipto que existen en el país constituyen un importante recurso melífero que ha contribuido a que la miel de eucalipto sea una de las principales variedades monoflorales producidas (Cabrera, 2007).

La miel de eucalipto de la región andina del Ecuador ha sido estudiada previamente y se han reportado sus propiedades biológicas, así como su capacidad antimicrobiana y habilidad para inhibir el crecimiento de *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *P. aeruginosa* y *E. coli* (Valdés-Silverio et al., 2018).

1.2. Planteamiento del problema

Los microorganismos causantes de infecciones han desarrollado resistencia a las familias de antibióticos y a los agentes antimicrobianos actualmente disponibles siendo cada vez más escasos los compuestos que se tiene a disposición para tratar una amplia gama de enfermedades (Aslam et al., 2018).

Particularmente, *S. aureus* y *P. aeruginosa* son microorganismos para los que se ha observado un desarrollo de resistencia a una alta variedad de antibióticos entre los que se incluyen los betalactámicos, glucopéptidos de estructura compleja, carbapenémicos y cefalosporinas de tercera generación (OMS, 2017).

Ambas bacterias se encuentran incluidas dentro de la lista de prioridad para investigación elaborada por la Organización Mundial de la Salud con objetivo de direccionar los estudios al desarrollo y conocimiento de nuevos compuestos y estrategias antimicrobianas que puedan combatirlas (Hall-Stoodley et al., 2004; Mah et al., 2003; OMS, 2017; Purrello et al., 2016), situación urgente, ya que en las últimas décadas, el progreso en estos avances ha ido decayendo de manera drástica (Anwar, Strap y Costerton, 1992; Aslam et al., 2018; Gilbert, Das y Foley, 1997).

En Ecuador existe poca información acerca de la miel de eucalipto y no se ha estudiado de manera completa sus propiedades antimicrobianas, propiedades que podrían ser de utilidad para el desarrollo de estrategias y usos complementarios en el tratamiento de infecciones con antibióticos y que además podrían añadir un valor agregado a estas mieles.

La provincia de Pichincha por estar ubicada en la región sierra del Ecuador, posee temperaturas que varían entre 8°C y 20°C y bajos niveles de presión atmosférica. Estas características hacen que la miel producida en esta zona se precipite y cambie a una apariencia sólida la cual genera desconfianza en los consumidores. Esto ocasiona que los productores calienten la miel y la sometan a tratamientos térmicos para que la miel se licue, pueda recuperar su apariencia original y sea más apetecible al consumidor.

Según varios estudios los tratamientos térmicos a altas temperaturas afectan las propiedades de la miel, el resultado de estos efectos puede variar según factores como el origen floral, la temperatura específica a la que se realiza el tratamiento térmico, y en el caso de la actividad antimicrobiana, del tipo de microorganismo

(Chen, Campbell, Blair y Carter, 2012; Escriche, Visquert, Carot, Doménech y Fito, 2008; Jahan, Islam, Alam, Gan y Khalil, 2015; Pimentel-González et al., 2017; Tosi, Lucero y Bulacio, 2004).

El conocimiento acerca de cómo los tratamientos térmicos afectan a la miel de eucalipto no está desarrollado en el país y por lo tanto, no se ha podido establecer un tratamiento térmico adecuado que esté enfocado en la situación local y que evite al máximo la reducción de las propiedades antimicrobianas de la miel.

1.3. Objetivo general

Evaluar la influencia de tratamientos térmicos en la capacidad antimicrobiana de la miel de eucalipto producida en la provincia de Pichincha-Ecuador.

1.4. Objetivos específicos

- Determinar un tratamiento térmico adecuado que evite la pérdida de propiedades antimicrobianas de la miel sobre biopelículas de *P. aeruginosa* y *S. aureus*.
- Comparar la actividad antimicrobiana existente entre cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus* al aplicar diferentes concentraciones de miel sometida a distintos tratamientos térmicos en experimentos de rompimiento de biopelículas preformadas e inhibición de biopelículas.

1.5. Justificación de la investigación

Resulta primordial aportar al conocimiento acerca de nuevas estrategias complementarias para combatir infecciones crónicas de bacterias con resistencia al tratamiento con antibióticos actualmente disponibles (Anwar et al., 1992; Aslam et al., 2018; Gilbert et al., 1997).

La miel de abeja tiene capacidad para reducir la formación de biopelículas (Lu et al., 2014; Maddocks et al., 2012; Morroni et al., 2018) y potenciar el efecto de otros antibióticos permitiéndoles recuperar su actividad antimicrobiana (Zamora et al., 2017).

El uso de miel como antimicrobiano da paso a nuevas estrategias para combatir biopelículas de bacterias resistentes tales como interferir con la comunicación bacteriana, los mecanismos de señalización y degradar de modo enzimático los componentes de la matriz extracelular. Estos mecanismos están basados en un modo de acción no microbicida y en consecuencia no representan una presión evolutiva directa sobre los microorganismos, logrando evitar el desarrollo de resistencia microbiana (Álvarez-Suarez et al., 2010; Blackledge, Worthington y Melander, 2013; Blair, Cokcetin, Harry y Carter, 2009; Maddocks et al., 2012).

Existen reportes iniciales acerca de las propiedades químicas y biológicas de la miel de eucalipto proveniente de Ecuador que indican sus potentes características comparables o superiores a las de orígenes florales de otras regiones geográficas (García-Tenesaca et al., 2017), por lo que resulta primordial continuar con las investigaciones y realizar un estudio que contribuya al conocimiento y a la

identificación de las propiedades antimicrobianas de la miel de este origen floral. De este modo, además de añadirle un valor comercial agregado, se da paso al desarrollo de futuras aplicaciones para el campo de la biomedicina, las industrias de alimentos y las industrias de cosméticos.

Mediante esta investigación se aporta además, al conocimiento acerca de cómo los tratamientos térmicos afectan a la miel de eucalipto y por lo tanto, al establecimiento de un tratamiento térmico para miel adecuado, que esté enfocado en la situación local y que evite al máximo la reducción de las propiedades antimicrobianas de la miel, mencionadas anteriormente.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Miel

2.1.1. Usos históricos

A lo largo de la historia de la humanidad la miel ha tenido un lugar valioso en la medicina tradicional, su primer uso aparece representado en pinturas que datan de hace aproximadamente 8000 años (Bansal, Medhi y Pandhi, 2005) y ha sido utilizada para tratar heridas, quemaduras y diversas enfermedades por culturas como la egipcia, asiria, china, griega, romana, maya y azteca (Al-Jabri, 2005; Vail, 2006). Debido a esto, ha sido sujeta a diversas investigaciones a nivel clínico y de laboratorio (Eteraf-Oskouei y Najafi, 2013) reconociéndose su actividad antibacteriana por primera vez en 1892 (Dustmann, 1979).

2.1.2. Propiedades antimicrobianas

Los efectos antimicrobianos de la miel han sido reportados en virus (Semprini et al., 2019; Watanabe, Rahmasari, Matsunaga, Haruyama y Kobayashi, 2014), hongos (Oro et al., 2015; Zubaidah, Irfan, Azian, Rosdan y Siti Amrah, 2018), y en alrededor a 60 especies de bacterias Gram positivas, Gram negativas, aerobias, anaerobias y cepas multirresistentes (Kwakman et al., 2008; Mama, Teshome y Detamo, 2019; Olaitan, Adeleke y Ola, 2007). Entre los principales géneros sobre los que se ha observado esta actividad están *Bacillus*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Yersinia*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Acinetobacter*, *Salmonella*, *Helicobacter*, *Streptococcus* y *Vibrio* (Asadi-Pooya, Pnjehshahin y Beheshti, 2003; Bansal et al., 2005; Eteraf-Oskouei y Najafi, 2013; Jeffrey, 1996). También, se han encontrado efectos sobre ciertas especies de hongos e incluso contra virus.

Los mecanismos de acción antibacteriana de la miel son diferentes a los de los antibióticos actuales (Eteraf-Oskouei y Najafi, 2013). Todavía se encuentran en debate, pero hay ciertos factores estrechamente relacionados a esta actividad (Álvarez Suarez, 2017). En primer lugar, la miel tiene un alto contenido de azúcar (Simon et al., 2009), estas moléculas se unen a moléculas libres de agua y por lo tanto, generan un efecto osmótico que extrae la humedad de su alrededor dejando sin disponibilidad de agua a las bacterias presentes y previniendo su crecimiento (Hadagali y Chua, 2014; Kwakman y Zaat, 2012). En segundo lugar, debido a que la enzima glucosa oxidasa producida por las abejas convierte la glucosa en ácido glucónico, la miel se acidifica y vuelve difícil la supervivencia y crecimiento de microorganismos. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generado como un producto alterno de esta reacción actúa como un antiséptico esporicida que esteriliza la miel (Álvarez Suarez, 2017; Zmantar, Kouidhi, Miladi, Mahdouani y Bakhrouf, 2010).

Finalmente, se han identificado diversos factores no relacionados al peróxido de hidrógeno que incluyen al metilglioxal (Kilty, Duval, Chan, Ferris y Slinger, 2011), péptidos como la defensina-1, compuestos fenólicos (Jagani, Chelikani y Kim, 2009; Kwakman y Zaat, 2012; Sousa, Morais Vieira y de Lima, 2011) y algunos componentes florales desconocidos (Nishio et al., 2016).

Una característica de la miel implicada en su actividad contra biopelículas es su capacidad para secuestrar e inactivar Fe (Boukraâ, 2016), la adquisición de este elemento es crucial para la formación de biopelículas y el establecimiento de infecciones por ciertos patógenos (Banin, Vasil y Greenberg, 2005; Lin, Shu, Huang y Cheng, 2012; Oglesby-Sherrouse, Djapgne, Nguyen, Vasil y Vasil, 2014).

Otro mecanismo puede deberse a la presencia de aminoácidos en su composición (Álvarez Suarez, 2017), se ha podido observar que la arginina suprime el crecimiento bacteriano, puede generar una sustancial reducción en la matriz insoluble de exopolisacáridos y altera la arquitectura de las biopelículas (He et al., 2016). Por otro lado, la metionina ha sido identificada como un adyuvante en el tratamiento de biopelículas (Gnanadhas, Elango, Datey y Chakravorty, 2015), este aminoácido puede generar una sobrerregulación de genes codificantes de ADNasa y una consecuente degradación del ADN extracelular presente en la matriz de exopolisacáridos (Koo, Allan, Howlin, Stoodley y Hall-Stoodley, 2017).

Un mecanismo bien caracterizado para modular los niveles del nucleótido mensajero intracelular secundario Di-GMP-cíclico (molécula importante en el proceso de formación de biopelículas) y mediar la dispersión de biopelículas es suministrar óxido nítrico (Barraud, Kelso, Rice y Kjelleberg, 2014; Barraud et al.,

2009). Este metabolito puede estar presente en la composición de la miel (Al-Waili, 2003).

Otros mecanismos que podrían ser responsables de la disrupción e inhibición, así como de promover la liberación de células planctónicas que son más susceptibles fuera de la biopelícula, están relacionados con el ataque a múltiples mecanismos como la producción de componentes de la matriz de sustancia polimérica extracelular (SPEs), el bloqueo de adhesinas con moléculas interceptoras, la degradación de SPEs en biopelículas establecidas, el ataque al sistema de autoinducción mediante péptidos y moléculas mensajeras (Koo et al., 2017) y la inhibición de enzimas clave como la piruvato quinasa, relacionadas con la producción de piruvato, molécula fundamental para regular los niveles de energía relacionados con la patogenicidad, las condiciones reproductivas y la formación de biopelículas (Vasu et al., 2015; Zoraghi et al., 2011).

2.1.3. Cristalización

La cristalización de la miel es un fenómeno natural, complejo y espontáneo por el cual la miel cambia de un estado líquido a un estado semisólido. Exceptuando por su textura y color, la miel cristalizada no sufre un deterioro en sus propiedades, sin embargo, cuando el proceso no es controlado, su apariencia puede volverse turbia y generar un aspecto desagradable para los consumidores (Conforti, Lupano, Malacalza, Arias y Castells, 2006; Hamdan, 2010).

Los factores principales que pueden afectar la cristalización de la miel son su composición de azúcares (principalmente fructosa y glucosa) y las condiciones de

su almacenamiento como temperatura, presión atmosférica y tiempo. La cristalización es favorecida cuando hay una predominancia de bajas temperaturas debido a una reducción en la solubilidad principalmente de la glucosa, que se separa del agua y toma la forma de pequeños cristales que se expanden por toda la miel, logrando de esta manera, que la solución cambie a una forma estable y saturada (Conforti et al., 2006; Venir, Spaziani y Maltini, 2010).

El balance entre los azúcares de su composición y su predominancia frente al agua, vuelve a la miel un fluido inestable. El tipo y tamaño de los cristales formados, así como la apariencia uniforme o parcialmente en capas dependerá del tipo de miel (Hamdan, 2010; Tappi et al., 2019).

2.1.4. Productores, comercialización y tratamientos térmicos

En la miel líquida la cristalización es un proceso no deseado por los apicultores, a pesar de que existen productos derivados como la crema de miel, que requieren de la formación de cristales muy pequeños (Conforti et al., 2006), no son de mucho interés para los productores, por lo que se han desarrollado técnicas para evitar este fenómeno. Se puede lograr una licuefacción de manera casera, sometiéndola a una temperatura aproximada de 55°C mediante baño maría, o también, en procesos a escala industrial, se pueden realizar procesos de pasteurización, con la finalidad de evitar que la miel se solidifique por el mayor tiempo posible y se contamine por bacterias y levaduras (Escriche et al., 2008).

2.2. Biopelículas

Las bacterias tienen la capacidad de adherirse a diferentes superficies y formar comunidades denominadas biopelículas, en donde las células crecen en agregados multicelulares encerrados en una matriz extracelular producida por las mismas bacterias. Las biopelículas pueden generar problemas debido a que pueden aparecer en dispositivos médicos o en superficies humanas y resultar en infecciones difíciles de tratar (López, Vlamakis y Kolter, 2010).

2.2.1. Adherencia

Los microorganismos formadores de biopelículas pueden adherirse a todos los materiales fabricados por humanos (plásticos, metales, cerámicas e híbridos) y a superficies biológicas (huesos, piel, esmalte dental, vías aéreas, mucosas, tejido conectivo, endotelio vascular) usando mecanismos específicos (adhesinas bacterianas de interacción-respuesta con el hospedador) y mecanismos no específicos (fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas) (Koo et al., 2017).

2.2.2. Viscoelasticidad

Es una propiedad presente que permite a las biopelículas absorber y dispersar energía, esto evita que se despegue cuando es expuesta a fuerzas mecánicas como la fuerza de rozamiento mecánica. El componente elástico permite a las biopelículas volver a su forma original durante perturbaciones intermitentes, mientras que el componente viscoso permite a las biopelículas fluir como líquidos cuando se les apliquen fuerzas (Koo et al., 2017).

2.2.3. Matriz de sustancia polimérica extracelular (EPS)

Está formada fundamentalmente de proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos pero su composición física y química puede variar entre especies y según las condiciones de crecimiento (tipos y abundancia de nutrientes, hidrodinámica, temperatura, concentración de oxígeno). Su función es proveer un andamio estructural para la estabilidad mecánica de la biopelícula y crear microambientes compartimentados que brinden protección a las células dentro de su estructura heterogénea de tres dimensiones (Koo et al., 2017).

2.2.4. Arquitectura

Existe un número limitado de formas comunes en la estructura de biopelículas (parches planos, montículos, hongos, torres, espirales) que no dependen necesariamente de la especie pero sí de la madurez de la biopelícula y de la producción de ciertos componentes y las condiciones de crecimiento. Las biopelículas observadas en especímenes clínicos tienden a formar agregados de células de diferentes tamaños y de una mezcla de especies en sistemas poli microbianos (Koo et al., 2017).

2.2.5. Fases de crecimiento

Un ciclo modelo de formación de una biopelícula puede ser subdividido en varias etapas importantes. El proceso comienza con la adhesión reversible de células planctónicas a una superficie adecuada para el crecimiento. La siguiente etapa

incluye una adherencia irreversible de bacterias que empezará a formar microcolonias en una matriz de exopolisacáridos. A continuación, las microcolonias de bacterias se irán expandiendo y su confluencia llevará a un fenotipo más estructurado con espacios no colonizados. Después, los espacios no colonizados se llenarán de bacterias que cubrirán la superficie entera y finalmente, las bacterias se desprenderán de la estructura para regresar al estado planctónico, dispersarse y colonizar nuevas superficies (Davey, Caiazza y O'Toole, 2003; Karatan y Watnick, 2009).

2.3. Microorganismos

2.3.1. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es un patógeno oportunista Gram negativo capaz de formar biopelículas que afecta de manera aguda o crónica principalmente a pacientes inmunocomprometidos. Es conocida como la principal causante de morbilidad y mortalidad en pacientes de fibrosis quística y como una de las principales causantes de infecciones nosocomiales. Debido a un amplio rango de mecanismos de adaptación, supervivencia y resistencia a múltiples clases de antibióticos, las infecciones producidas por cepas de ésta bacteria pueden comprometer una amenaza a la vida y han emergido como un problema de salud pública global (Moradali et al., 2017).

Las cepas de *P. aeruginosa* poseen una capacidad metabólica alta que implica la producción de un amplio rango de metabolitos secundarios y polímeros, así como una marcada habilidad para utilizar varias fuentes de carbono y aceptores de

electrones, cualidades que les permiten poder adaptarse en diferentes ambientes, así como prevalecer y persistir en ambientes clínicos. Además, poseen competencias altas para desarrollar mecanismos de respuesta a condiciones desfavorables que les permiten resistir a tratamientos terapéuticos. Entre los principales mecanismos se incluyen: el mecanismo de percepción de cuórum o autoinducción, el alternar su movilidad entre movimientos sésiles y motilidad, la formación de biopelículas, mecanismos de resistencia a antibióticos, sistemas *CRISPR-Cas*, la formación de células persistentes, la respuesta estricta, entre otros (Moradali et al., 2017).

P. aeruginosa está relacionada con enfermedades infecciosas particularmente peligrosas en residencias de ancianos, hospitales, y entre pacientes que necesiten ser atendidos con dispositivos médicos como catéteres permanentes pudiendo causar obstrucción crónica en los pulmones e infecciones habituales en el tracto urinario (Dickinson y Bisno, 1993; Isiklar, Darouiche, Landon y Beck, 1996; Mah et al., 2003; Nicolle, 2014). Tiene una presencia importante en quemaduras y heridas donde los tratamientos de antibióticos no pueden erradicarla debido al desarrollo de resistencia mutacional y a la tolerancia multifactorial de las biopelículas que forma (Ciofu y Tolker-Nielsen, 2019).

2.3.2. Staphylococcus aureus

S. aureus es una bacteria Gram positiva capaz de producir enfermedades que van desde infecciones leves de la piel hasta enfermedades crónicas y difíciles de curar como osteomielitis, periodontitis, infecciones ortopédicas, úlceras cutáneas, endocarditis infectivas, sepsis, abscesos y neumonía. Estas infecciones se

relacionan comúnmente con la inserción de dispositivos médicos en el cuerpo y pueden implicar riesgo de muerte (Gould et al., 2011).

Un factor principal en las infecciones generadas por *S. aureus* es su capacidad para colonizar superficies como tejidos cutáneos y membranas mucosas, de éste modo puede estar presente en un alto porcentaje de individuos sanos y utilizarlos como huéspedes temporales para su transporte transitorio (Shallcross, Fragaszy, Johnson y Hayward, 2013).

La patogénesis de *S. aureus* es mediada por la secreción de factores de virulencia como el factor leucocidina Pantón-Valentine, una toxina que induce la formación de poros en los receptores complemento de la membrana celular de leucocitos y que puede causar lesiones de necrosis en tejidos cutáneos y pulmonares (Darboe et al., 2019; Rasigade et al., 2010; Shallcross et al., 2013). Además, puede secretar otros tipos de toxinas, antígenos y proteasas que interactúan con diversas células inflamatorias y llevan a una desregulación de la hemostasia en el tejido afectado (Sonesson et al., 2017).

La forma predominante de vida bacteriana de *S. aureus* es en biopelículas, lo que le confiere una gran habilidad para evadir terapias de múltiples antibióticos, en el caso de la resistencia a metilina, esta habilidad es codificada por el gen *mecA* (Purrello et al., 2016; Stryjewski y Corey, 2014).

En los últimos años, debido a la naturaleza altamente patógena de este microorganismo y a un abundante uso de antibióticos de la familia de β -lactámicos se han podido detectar infecciones causadas por cepas resistentes a metilina en más ambientes además de los nosocomiales (Cosgrove et al., 2003). En ambos

ambientes, los valores de morbilidad y mortalidad han sido altamente significativos (Ozekinci et al., 2014).

2.4. Fundamentos técnicos

2.4.1. Cultivo de microorganismos

Los microorganismos son omnipresentes, se encuentran en el suelo, el aire, el agua, la comida, las aguas residuales, las superficies del cuerpo y muchos lugares más. Cada ambiente está repleto con ellos. Los microbiólogos separan estas poblaciones mezcladas en especies individuales para poder estudiarlas. Un cultivo que contenga una aislada e inalterada especie de célula es llamado cultivo puro. Para aislar y estudiar microorganismos en cultivos puros, los microbiólogos requieren aparatos básicos de laboratorios y la aplicación de técnicas específicas. La supervivencia y el crecimiento continuo de microorganismos dependen de un adecuado suministro de nutrientes y un entorno favorable para el crecimiento. Para sobrevivir, la mayoría de microbios puede usar sustancias solubles de bajo peso molecular que se derivan frecuentemente a partir de la degradación enzimática de compuestos complejos, una solución que contenga esos nutrientes es llamada medio de cultivo. Básicamente, todos los medios de cultivo son líquidos, semisólidos o sólidos. Un medio de cultivo líquido carece de un agente solidificante y es llamado caldo de cultivo. Los caldos de cultivo son útiles para el cultivo de un alto número de células bacterianas en un volumen pequeño o mediano, y son particularmente útiles cuando un ensayo requiere un alto número de células bacterianas saludables (Cappuccino y Welsh, 2017).

2.4.2. Caldo de cultivo BD *Tryptic Soy Broth* (TSB)

El medio de cultivo BD *Tryptic Soy Broth* (Medio de soja y caseína) es un medio líquido enriquecido de uso general usado en procesos cualitativos para el enriquecimiento y cultivo de microorganismos aeróbicos y anaeróbicos facultativos. En microbiología clínica, puede ser usado para el enriquecimiento, la suspensión y el cultivo de cepas que se hayan aislado en otros medios. La digestión de la soja y la caseína a través de enzimas provee aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas. El cloruro de sodio preserva el equilibrio osmótico, la glucosa es una fuente de energía, y el fosfato de potasio cumple la función de tampón para regular el pH (BD, 2008).

2.4.3. Sustancias tampón

El crecimiento y supervivencia de microorganismos es bastante influenciado por el pH de su entorno, y todas las bacterias y microorganismos difieren en sus requerimientos. Cada especie tiene la habilidad de crecer en un rango de pH específico, que puede ser amplio o limitado. Este pH específico debe reflejar a las adaptaciones del ambiente natural de la bacteria. Pese a su diversidad y al hecho de que ciertos organismos pueden crecer en valores de pH extremos, se puede hacer un rango general. El rango específico para bacterias se encuentra entre 4 y 9, con un óptimo entre 6.5 y 7.5. Ya que un entorno neutral o cercano al neutral es generalmente ventajoso para el crecimiento de microorganismos, el pH de un medio de laboratorio es frecuentemente ajustado a 7. Las actividades metabólicas de los microorganismos generan la producción de desechos, como ácidos producidos de la degradación de carbohidratos y álcali a partir del rompimiento de proteínas, y esto puede causar cambios en el pH que perjudiquen al crecimiento. Para retardar este

cambio, existen sustancias químicas que actúan como tampones y son frecuentemente utilizadas en los ensayos con microorganismos. Un sistema tampón comúnmente usado es el KH_2PO_4 (Cappuccino y Welsh, 2017), fosfato monobásico de potasio, que es una sal soluble considerada como un recurso de fósforo y potasio (DrugBank, 2019).

2.4.4. Ensayos de inhibición de biopelículas y de destrucción de biopelículas preformadas

Los ensayos de inhibición de biopelículas consisten en suministrar la sustancia que se quiere probar como agente antimicrobiano en el inicio del cultivo celular, suministrando la sustancia junto con los microorganismos, de este modo, se puede apreciar si el compuesto tiene efectos al inhibir la formación de la biopelícula (Kumar y Menon, 2006; Lu et al., 2014; Shin et al., 2002).

Los ensayos de rompimiento de biopelículas consisten en suministrar la sustancia que se quiere probar como agente antimicrobiano después de que la biopelícula esté formada, de este modo, se puede apreciar si el compuesto tiene efectos de destrucción en la biopelícula preformada (Kumar y Menon, 2006; Lu et al., 2014; Shin et al., 2002).

2.4.5. Espectrofotometría

La espectrofotometría es un método de análisis basado en la Ley de Beer-Lambert en el que se mide la cantidad de luz que absorbe un compuesto al medir la

intensidad de la luz cuando se pasa un haz luminoso a través del analito, puede ser utilizado en la determinación de la cantidad de una sustancia química (Skoog y West, 2015).

2.4.6. Curvas de relación dosis respuesta

La relación dosis respuesta es una asociación entre la dosis de un compuesto y su incidencia en un efecto biológico definido dentro de una población de organismos expuesta. Se expresa usualmente como un porcentaje (Moffett, El-Masri y Fowler, 2007).

3. PROCEDIMIENTOS

3.1. Población y muestra

Las mieles utilizadas fueron recolectadas directamente de los apicultores en la provincia de Pichincha, localizada en la región interandina de Ecuador. Los cantones y distritos de procedencia de las muestras fueron: Quito (Tumbaco, Pintag, Amaguaña y Chillogallo), Mejía (Machachi) y Cayambe (Cangahua). Se escogieron un total de 10 apicultores, número basado en el número de apiarios (≥ 20), lo que representa el 50% del total de colmenas de miel en la provincia y se tomaron tres muestras al azar de cada apiario. En total se analizaron 30 muestras de miel para cada uno de los análisis posteriores. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente (Cooper, Molan y Harding, 2002; Valdés-Silverio et al., 2018).

3.2. Contenido polínico

El origen botánico de las mieles fue confirmado mediante una caracterización palinológica. Se realizó un análisis microscópico cualitativo y una determinación de la frecuencia de las clases de polen presentes en las muestras siguiendo los procedimientos previamente reportados (Louveaux, Maurizio y Vorwohl, 1978; Von Der Ohe, Persano Oddo, Piana, Morlot y Martin, 2004). La morfología de los granos de polen fue comparada a la de catálogos de polen publicados (Pfeiffer, Bonilla y Parra, 2014).

3.3. Preparación de las muestras de miel

Para los tratamientos de temperatura se dividieron las muestras de miel en tres grupos. Las muestras del primer grupo no fueron sometidas a ningún tratamiento térmico, las del segundo grupo fueron tratadas térmicamente hasta que la miel se volviera líquida utilizando baño maría a $T=45^{\circ}\text{C}$ (24h) y, las del tercer grupo, a $T=60^{\circ}\text{C}$ (3h). Posteriormente, se realizaron soluciones de miel para cada tratamiento térmico a las concentraciones de 5%, 10%, 15% y 20%. Las soluciones fueron diluidas en una solución tampón preparada a partir de fosfato de potasio básico KH_2PO_4 (50 mM, pH 6.5) (*Fisher scientific, USA*).

3.4. Cultivo de microorganismos

Se realizaron cultivos bacterianos independientes de *S. aureus* ATCC: 25923, *S. aureus* resistente a metilina (Código: 333), *P. aeruginosa* ATCC: 27853 y *P.*

aeruginosa multirresistente (Código: P28), para lo cual se inoculó el microorganismo en medio líquido *Tryptic Soy Broth* (TSB, BD™, USA) y se incubó (37°C, 24h, 90 rpm) usando una incubadora de agitación (311DS *Environmental Shaking Incubator*, Labnet International, USA). A las 24h, se tomó una alícuota del cultivo y se inoculó a otro tubo con medio líquido TSB hasta lograr una turbidez con un valor de 0,5 en la escala de *McFarland* equivalente a 1.5×10^8 unidades formadoras de colonia (UFC), medida mediante el programa de turbidez con valores equivalentes en la escala FAU de 39, 40 y 41 utilizando un colorímetro (*Spectroquant® Colorimeter Move 100*, Merck, Germany) (Kumar y Menon, 2006; Lu et al., 2014; Shin et al., 2002).

3.5. Ensayos espectrofotométricos

3.5.1. Destrucción de biopelículas preformadas

Para los ensayos de destrucción de biopelículas preformadas se realizó una adaptación de métodos previamente descritos para la cuantificación de biopelículas a través de lecturas de absorbancia (Kumar y Menon, 2006; Lu et al., 2014; Shin et al., 2002).

Inicialmente, el cultivo bacteriano preparado con turbidez equivalente a 0,5 en la escala de *McFarland* se distribuyó en alícuotas de 200 µL en placas de microtitulación de poliestireno 96 pocillos (*Nunclon™ Delta Surface Treatment*, Cat No: 167008, *Thermo Scientific, Denmark*) y se procedió a incubación (37°C, 48h, 90rpm) usando una incubadora de agitación (311DS *Environmental Shaking Incubator*, Labnet International, USA). A continuación, se realizaron dos lavados de

los cultivos para remover el medio de crecimiento y cualquier bacteria planctónica no adherida pipeteando 200 μ L de una solución tampón preparada a partir de fosfato de potasio básico (50 mM KH_2PO_4 , pH 6.5) (*Fisher scientific, USA*), y los cultivos se secaron a temperatura ambiente (15-20°C, 20 min) (Kumar y Menon, 2006; Lu et al., 2014; Shin et al., 2002).

Con objeto de establecer un valor de longitud de onda para medir la absorbancia de las biopelículas adheridas y poder cuantificarla se realizó una curva de calibración generada mediante el programa Gen5 (*Microplate Reader and Imager Software, Agilent Technologies, USA*) con un lector de microplacas (*BioTek SynergyTM HT, Agilent Technologies, USA*) y se procedió a realizar una lectura inicial por triplicado a 270 nm de los cultivos previamente secos (Kumar y Menon, 2006; Lu et al., 2014; Shin et al., 2002).

Después de realizar la lectura inicial, se aplicaron 100 μ L de la solución de tratamiento de miel previamente preparada a cada pocillo del cultivo y se dejó en incubación (37°C, 24h, 90rpm). Posteriormente, se realizaron dos lavados de los pocillos, pipeteando 200 μ L de la solución tampón, y las placas se secaron a temperatura ambiente (15-20°C, 20 min) y se realizó una segunda lectura de absorbancia a la misma longitud de onda (Kumar y Menon, 2006; Lu et al., 2014; Shin et al., 2002).

Mediante la lectura de pocillos blanco sin cultivo ni medio, de pocillos antes de aplicar el tratamiento de miel (% inicial de biopelícula) y de pocillos después de aplicar la solución de tratamiento de miel (% final de biopelícula) se pudo cuantificar la reducción en las biopelículas preformadas debida al tratamiento (Kumar y Menon, 2006; Lu et al., 2014; Shin et al., 2002).

3.5.2. Inhibición de biopelículas

Para los ensayos de inhibición de biopelículas se realizó una adaptación de métodos previamente descritos para la cuantificación de biopelículas a través de lecturas de absorbancia (Kumar y Menon, 2006; Lu et al., 2014; Shin et al., 2002).

Inicialmente, el cultivo bacteriano preparado con turbidez equivalente a 0,5 en la escala de *McFarland* se distribuyó en alícuotas de 200 μ L en placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos (*Nunclon™ Delta Surface Treatment, Cat No: 167008, Thermo Scientific, Denmark*) y se dejó en incubación (37°C, 48h, 90rpm) usando una incubadora de agitación (*311DS Environmental Shaking Incubator, Labnet International, USA*). A continuación, se realizaron dos lavados de los cultivos para remover el medio de crecimiento y cualquier bacteria planctónica no adherida pipeteando 200 μ L de una solución tampón preparada a partir de fosfato de potasio básico (50 mM KH_2PO_4 , pH 6.5) (*Fisher scientific, USA*), y los cultivos se secaron a temperatura ambiente (15-20°C, 20 min) (Kumar y Menon, 2006; Lu et al., 2014; Shin et al., 2002).

A continuación, se realizaron mediciones a 270 nm siguiendo la metodología del apartado anterior (*ver 1.5.1.*). Mediante la lectura de pocillos blanco sin cultivo ni medio, de pocillos control sin la aplicación del tratamiento de miel (% total de biopelícula) y de pocillos donde se cultivó las bacterias y simultáneamente se aplicó las soluciones tratamiento de miel (% final de biopelícula) se pudo cuantificar la inhibición en la formación de biopelículas debidas al tratamiento (Kumar y Menon, 2006; Lu et al., 2014; Shin et al., 2002).

3.5.3. Análisis estadísticos de ensayos espectrofotométricos

Las muestras fueron analizadas en duplicado. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando la versión para *Windows* del *software IBM SPSS Statistics 25.0*. Se usó un análisis *One-Way ANOVA* para determinar las diferencias significativas entre las muestras utilizando una corrección de Bonferroni para la comparación múltiple entre muestras. En todos los casos, un valor de p -value < 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Población y contenido polínico

Se recolectaron un total de 30 muestras de miel que fueron almacenadas en oscuridad y a temperatura ambiente hasta su posterior uso para los diferentes ensayos. El análisis polínico demostró que las mieles tuvieron una presencia mayor al 50% de polen relacionado a la especie de *Eucalyptus globulus*, extensivamente plantada en la meseta central del país, con un mayor crecimiento en las áreas entre altitudes de 2.000 m y 2.900 m sobre el nivel del mar. Los análisis concuerdan con estudios realizados previamente en mieles de eucalipto (Valdés-Silverio et al., 2018).

4.2. Actividad antimicrobiana

Los resultados mostrados para actividad antimicrobiana son generados en base a la media de los datos obtenidos a partir del análisis de 30 muestras de miel de eucalipto.

La miel genera un efecto inhibitorio en el proceso de formación de biopelículas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* ya que su acción a diferentes concentraciones es significativamente mayor a la del control (*Figura 1*). Los valores de actividad antimicrobiana obtenidos (*Anexos: Tabla 1 y 2*) son similares a los reportados en estudios previos para miel monofloral de eucalipto (García-Tenesaca et al., 2017; Sindi et al., 2019), mientras que difieren para mieles de otros orígenes florales como manuka (*L. scoparium*), aguacate (*P. americana*), nabo (*B. rapa*), kanuka (*K. ericoides*), miel de Kenya (*Faurea saligna*), miel polifloral de Cuba, entre otras (da Silva, Aazza, Faleiro, Miguel y Neto, 2016; Lu et al., 2019, 2014; Morroni et al., 2018; Zamora et al., 2017). Esta diferencia puede darse porque factores como la región geográfica de donde proviene el néctar, el recurso floral de origen y las condiciones de almacenamiento son distintos e influyen en los niveles de las principales sustancias antibacteriales componentes de la miel (metilglioxal, peróxido de hidrógeno, compuestos fenólicos) (Adams et al., 2008; Sherlock et al., 2010; Stephens et al., 2010).

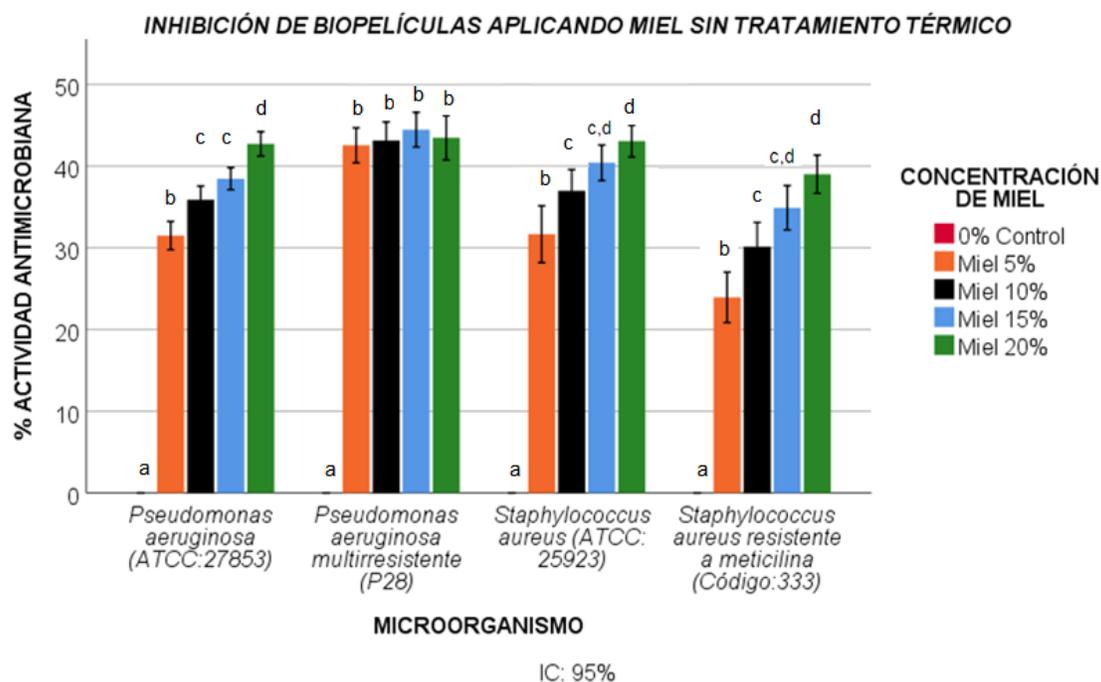


Figura 1. Gráfico de barras con el porcentaje de actividad antimicrobiana para cada concentración de miel sin tratamiento térmico aplicada en experimentos de inhibición.

- a) Las barras muestran la media e intervalo de confianza (95%) del total de las muestras (n= 30) (Ver Anexos: *Tablas 1-4*).
- b) Las letras distintas indican que existen diferencias significativas, mientras que letras iguales implican que no existen diferencias significativas con un valor-p < 0.05.

4.3. Tratamientos térmicos

A continuación se describen los resultados obtenidos al comparar la efectividad de la miel (20%) sometida a los diferentes tratamientos térmicos (sin tratamiento, tratamiento a 45°C y tratamiento a 60°C) contra cada bacteria.

La actividad antibacteriana de la miel en los experimentos de inhibición de biopelículas es diferente según el microorganismo. Contra *S. aureus* resistente a meticilina (Código 333) no existen diferencias significativas entre los tratamientos térmicos (*Figuras 2a, 2b, 2c*); contra *P. aeruginosa* ATCC: 27853 y *P. aeruginosa* multirresistente (Código: P28), la inhibición es significativamente mayor con miel sin tratamiento térmico (*Figuras 2a, 2b, 2c*); y, contra *S. aureus* ATCC: 25923 tiene más efectividad el tratamiento a 60°C en comparación a la miel sin tratamiento (*Figura 2c*). En los experimentos de rompimiento de biopelículas preformadas existe una predominancia en la efectividad de la miel tratada a 60°C, su actividad antibacteriana es significativamente mayor contra *P. aeruginosa* ATCC: 27853, *P. aeruginosa* multirresistente (Código: P28) y *S. aureus* ATCC: 25923 (*Figuras 2d, 2e, 2f*); para *S. aureus* resistente a meticilina (Código: 333) el efecto de rompimiento fue mayor aplicando miel sin tratamiento térmico. Estas variaciones en la actividad antibacteriana de la miel después de ser sometida a diferentes temperaturas han sido reportadas previamente, mostrándose una pérdida en el efecto antimicrobiano y en las propiedades de calidad de la miel en algunos casos (Escriche et al., 2008; Jahan et al., 2015; Tosi et al., 2004), así como también un aumento y potenciación en otros (Chen et al., 2012; Pimentel-González et al., 2017). Las variaciones pueden darse porque los mecanismos de acción antibacterial de la miel que actúan a cada temperatura son diferentes entre sí, a medida que el calentamiento aumenta pueden formarse y degradarse sustancias generando un cambio en la composición química, lo que puede tener un efecto tóxico o beneficioso para cada bacteria

(Pimentel-González et al., 2017). Las variantes en los niveles de sustancias como compuestos fenólicos entre la miel sometida a tratamientos térmicos dependerán del origen floral y su actividad antibacteriana dependerá de la bacteria tratada (Pimentel-González et al., 2017). Por otro lado, el cambio en los niveles de peróxido de hidrógeno a través de los tratamientos térmicos, no siempre puede ser relacionado con la actividad antimicrobiana (Chen et al., 2012). La variación en el tiempo de calentamiento puede ser un factor influyente, las mieles tratadas a 45°C fueron sometidas por más tiempo que las tratadas a 60°C lo que podría generar una mayor degradación de compuestos importantes, efectos similares han sido reportados previamente en procesos de pasteurización y calentamiento, en donde, a pesar de que las temperaturas utilizadas son relativamente altas, la pérdida de calidad y propiedades han podido evitarse manteniendo tiempos de procesamiento cortos (Escriche et al., 2008; Tosi et al., 2004).

Las biopelículas en estado de formación mostraron mayor vulnerabilidad (*Anexos tabla 1 y 2*) en comparación a las biopelículas desarrolladas (*Anexos tabla 3 y 4*) en el caso de la aplicación de mieles sin tratamiento térmico contra todos los microorganismos (*Figuras 2a, 2d*); para el tratamiento de 45°C se observó el mismo efecto con excepción de *P. aeruginosa* multirresistente (Código: P28) (*Figuras 2b, 2e*) y; en el caso de 60°C solo ocurrió para *S. aureus* resistente a meticilina (Código: 333) (*Figuras 2c, 2d*). Esto puede ocurrir porque las biopelículas pueden ser más vulnerables en el momento de su desarrollo inicial al no haber completado su formación y se ha observado previamente para mieles de manuka en *S. aureus* (Lu et al., 2014) y en *P. aeruginosa* (Lu et al., 2019). La actividad antibacteriana contra las cepas de *S. aureus* (*Figura 2*), puede darse porque la miel causa aberraciones y disrupción en el proceso de división de su ciclo celular y genera un debilitamiento en la pared bacteriana, además, mantiene a la bacteria en una situación de estrés constante (Camplin y Maddocks, 2014; Jenkins, Burton y Cooper, 2011a, 2011b). Por otro lado, la sobrevivencia de *P. aeruginosa* multirresistente (Código: P28)

(Figuras 2d, 2b, 2c), puede tener relación con el desarrollo de múltiples estrategias para defenderse en compensación a la debilidad de su pared celular (Moradali et al., 2017), la dificultad para tratar a esta bacteria con miel ha sido reportada previamente (Morrone et al., 2018).

4.4. Relación dosis - respuesta

La aplicación de miel en diferentes concentraciones (5%, 10%, 15%, 20%) causa tres tipos de comportamientos diferentes al ir aumentando la dosis: en primer lugar existe un aumento de la respuesta antibacteriana (Figuras 2a, 2c y 2d), se da porque la mortalidad del microorganismo depende del compuesto aplicado y ha sido reportado previamente (da Silva et al., 2016; García-Tenesaca et al., 2017; Lu et al., 2019, 2014; Morrone et al., 2018; Sindi et al., 2019; Zamora et al., 2017). En segundo lugar existe un aumento del crecimiento bacteriano (*P. aeruginosa* multirresistente (Código: P28) en la Figura 2b y *S. aureus* resistente a meticilina (Código: 333) en la Figura 2e), puede darse porque la miel ha perdido su efecto, posiblemente debido a un cambio en su composición y al no haber sustancias que interfieran, los microorganismos crecen. Finalmente, existe un comportamiento en el que la actividad antibacteriana es alta a concentraciones bajas y disminuye progresivamente (*P. aeruginosa* ATCC: 27853) en la Figura 2b y 2e, *S. aureus* resistente a meticilina (Código: 333) en la Figura 2f), lo que puede darse por la presencia en la miel de una sustancia agonista con actividad antibacteriana y otra sustancia antagonista con capacidad de bloquearla, y porque la sustancia antagonista predomina en la composición, a medida que se aumente la concentración de miel, su efecto será más claro y predominante, pero a concentraciones bajas, no necesariamente es apreciable (Pleuvry, 2004).

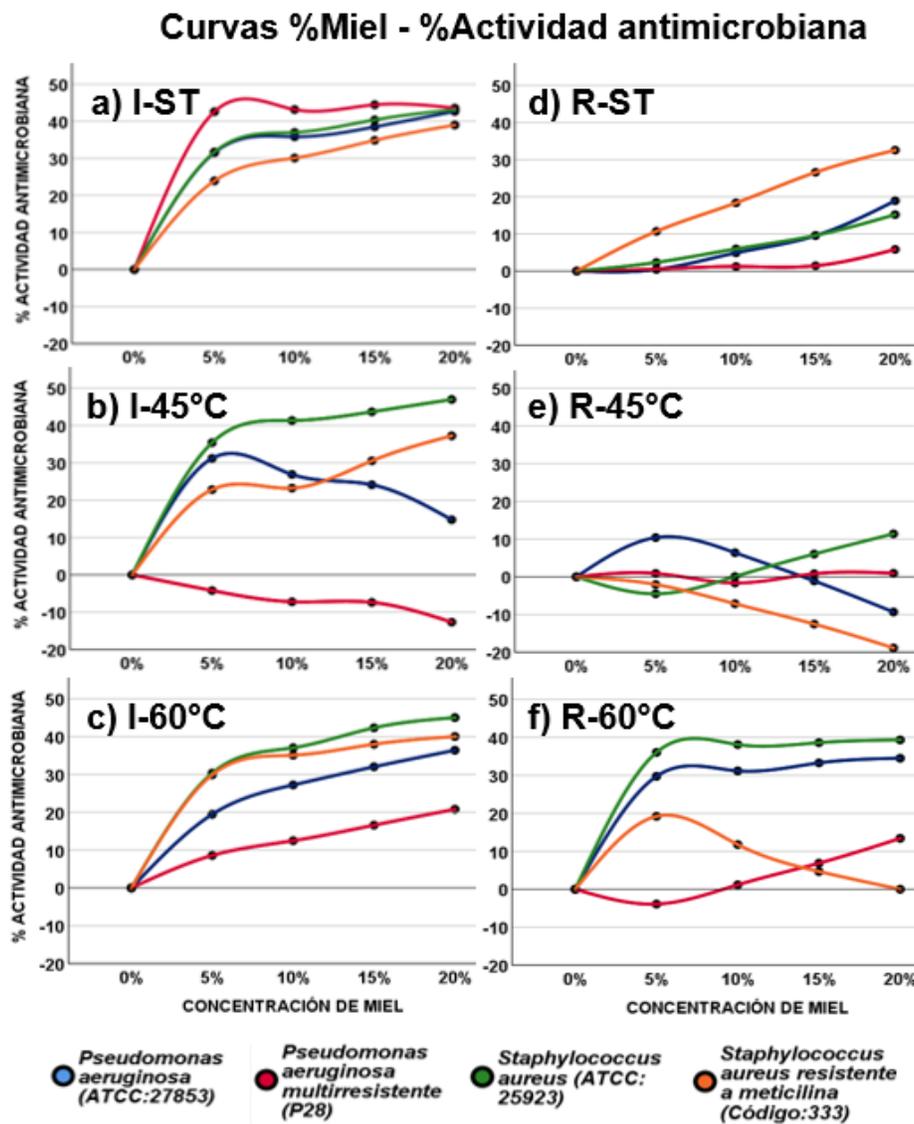


Figura 2. Curvas dosis respuesta de miel de eucalipto contra biopelículas.

a) Miel aplicada a diferentes concentraciones (eje x) vs el % de actividad antimicrobiana (eje y) en experimentos de inhibición (figuras 2. a, b, c) y rompimiento (literales d, e, f), los porcentajes positivos representan un efecto de muerte celular mientras que los negativos corresponden a un efecto de crecimiento celular.

b) Actividad de miel sin tratamiento térmico (figuras 2. a, d), a 45°C (figuras 2. b, e) y a 60°C (figuras 2. c, f).

c) Cada curva representa un microorganismo y cada punto dentro de la curva representa la media de respuesta del total de mieles (n=30) a esa concentración.

e) Los datos de las medias, máximos y mínimos se encuentran detallados en las *Tablas 1-4* de *Anexos*.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

La actividad antibacteriana de la miel es mayor que el control lo que indicaría que tiene la capacidad de inhibir parcialmente biopelículas y romper biopelículas bacterianas preformadas.

La miel sin tratamiento térmico tiene alta efectividad en procesos de inhibición contra todas las bacterias y poca efectividad contra *P. aeruginosa* multirresistente (Código: P28) en procesos de inhibición y en procesos de rompimiento cuando ha sido tratada a 45°C y a 60°C.

La miel sometida a tratamiento térmico de 45°C genera menor actividad antimicrobiana que los otros tratamientos térmicos en la mayoría de los casos, en consecuencia, no es la mejor alternativa frente a la miel sin tratamiento térmico. Por el contrario, el tratamiento térmico a 60°C mantiene su actividad y podría ser un tratamiento alternativo para evitar la cristalización y perder al mínimo la actividad antimicrobiana.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda realizar una caracterización de las mieles sin tratamiento térmico y de las mieles sometidas a los tratamientos térmicos de 45°C y 60°C mediante un

cromatograma. Al observar los picos de los diferentes compuestos como polifenoles, péptidos, proteínas y otras sustancias, mediante un equipo de espectrofotometría de masas, y aplicar el mismo análisis a las mieles de las diferentes temperaturas se podría comparar y apreciar si existen compuestos que se degradan o se forman en cada tratamiento y, a continuación, poder relacionar su presencia o ausencia con el efecto de actividad antimicrobiana de la miel en los diferentes microorganismos.

Además, se recomienda efectuar una cantidad de ensayos equivalentes a los realizados utilizando un control compuesto con una solución formada con los azúcares conocidos predominantes en la miel, de este modo se podría comparar los efectos antibacterianos y profundizar más en las hipótesis acerca de los mecanismos responsables de los efectos antibacterianos de la miel.

Finalmente, se recomienda realizar ensayos probando concentraciones más altas de miel de eucalipto para poder determinar cuál es la concentración inhibitoria media máxima IC_{50} para ensayos de rompimiento de biopelículas e inhibición de biopelículas preformadas.

REFERENCIAS

- Adams, C. J., Boulton, C. H., Deadman, B. J., Farr, J. M., Grainger, M. N. C., Manley-Harris, M., y Snow, M. J. (2008). *Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (Leptospermum scoparium) honey. Carbohydrate Research, 343(4), 651-659.*
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.12.011>
- Al-Jabri, A. A. (2005). *Honey, milk and antibiotics. African Journal of Biotechnology.*
- Al-Waili, N. S. (2003). *Identification of Nitric Oxide Metabolites in Various Honeys: Effects of Intravenous Honey on Plasma and Urinary Nitric Oxide Metabolites Concentrations. Journal of Medicinal Food, 6(4), 359-364.*
<https://doi.org/10.1089/109662003772519921>
- Álvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Díaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., ... Battino, M. (2010). *Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. Food and Chemical Toxicology, 48(8-9), 2490-2499.* <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.021>
- Álvarez Suarez, J. M. (2017). *Bee products - chemical and biological properties.* En J. M. Álvarez Suarez (Ed.), *Bee Products - Chemical and Biological Properties.*
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-59689-1>
- Álvarez Suarez, J. M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., y Battino, M. (2010). *Contribution of honey in nutrition and human health: a review. Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism, 3(1), 15-23.*
<https://doi.org/10.1007/s12349-009-0051-6>
- Anwar, H., Strap, J. L., y Costerton, J. W. (1992). *Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. Antimicrobial agents and chemotherapy, 36(7), 1347-1351.* Recuperado el 20 de octubre de 2019 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1510427>
- Asadi-Pooya, A. A., Pnjehshahin, M. R., y Beheshti, S. (2003). *The Antimycobacterial Effect of Honey: An in vitro Study. Rivista di Biologia - Biology*

- Forum*, 96(3), 491-495. Recuperado el 21 de octubre de 2019 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15055885>
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., ... Baloch, Z. (2018). *Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis*. *Infection and Drug Resistance*, Vol. 11, pp. 1645-1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>
- Ayres, H. M., Payne, D. N., Furr, J. R., y Russell, A. D. (1998). *Effect of permeabilizing agents on antibacterial activity against a simple Pseudomonas aeruginosa biofilm*. *Letters in applied microbiology*, 27(2), 79-82. Recuperado el 22 de octubre de 2019 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9750327>
- Banin, E., Vasil, M. L., y Greenberg, E. P. (2005). *Iron and Pseudomonas aeruginosa biofilm formation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 11076-11081. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504266102>
- Bansal, V., Medhi, B., y Pandhi, P. (2005). *Honey a remedy rediscovered and its therapeutic utility*. *Kathmandu University medical journal (KUMJ)*, 3(3), 305-309. Recuperado el 23 de octubre de 2019 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650599>
- Barbosa, L. C. A., Filomeno, C. A., y Teixeira, R. R. (2016, diciembre 1). *Chemical variability and biological activities of Eucalyptus spp. essential oils*. *Molecules*, Vol. 21. <https://doi.org/10.3390/molecules21121671>
- Barraud, N., Kelso, M., Rice, S., y Kjelleberg, S. (2014). *Nitric Oxide: A Key Mediator of Biofilm Dispersal with Applications in Infectious Diseases*. *Current Pharmaceutical Design*, 21(1), 31-42. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140905112822>
- Barraud, N., Schleheck, D., Klebensberger, J., Webb, J. S., Hassett, D. J., Rice, S. A., y Kjelleberg, S. (2009). *Nitric oxide signaling in Pseudomonas aeruginosa biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal*. *Journal of Bacteriology*, 191(23), 7333-7342. <https://doi.org/10.1128/JB.00975-09>

- BD. (2008). *Instructions for use Ready-to-use bottled media BD™ Tryptic Soy Broth (TSB) intended use*. Recuperado el 24 de octubre de 2019 de <http://www.bd.com>
- Blackledge, M. S., Worthington, R. J., y Melander, C. (2013). *Biologically inspired strategies for combating bacterial biofilms*. *Current Opinion in Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.07.004>
- Blair, S. E., Cokcetin, N. N., Harry, E. J., y Carter, D. A. (2009). *The unusual antibacterial activity of medical-grade Leptospermum honey: Antibacterial spectrum, resistance and transcriptome analysis*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 28(10), 1199-1208. <https://doi.org/10.1007/s10096-009-0763-z>
- Boukraâ, L. (2016). *Honey in traditional and modern medicine* (Taylor and Francis Ltd, Ed.). London.
- Branda, S. S., Vik, S., Friedman, L., y Kolter, R. (2005). *Biofilms: the matrix revisited*. *Trends in microbiology*, 13(1), 20-26. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006>
- Cabrera, J. (2007). Perspectivas de la Apiterapia en Ecuador. En *Primer Simposio Internacional de Apicultura*. Quito.
- Camplin, A. L., y Maddocks, S. E. (2014). *Manuka honey treatment of biofilms of Pseudomonas aeruginosa results in the emergence of isolates with increased honey resistance*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 13(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-13-19>
- Cappuccino, J. G., y Welsh, C. (2017). *Microbiology : a laboratory manual*.
- Chen, C., Campbell, L. T., Blair, S. E., y Carter, D. A. (2012). *The effect of standard heat and filtration processing procedures on antimicrobial activity and hydrogen peroxide levels in honey*. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00265>
- Chua, L. S., Lee, J. Y., y Chan, G. F. (2013). *Honey protein extraction and determination by mass spectrometry*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(10), 3063-3074. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6630-2>
- Ciofu, O., y Tolker-Nielsen, T. (2019). *Tolerance and resistance of pseudomonas*

- aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents how *P. aeruginosa* can escape antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00913>
- Conforti, P. A., Lupano, C. E., Malacalza, N. H., Arias, V., y Castells, C. B. (2006). *Crystallization of Honey at -20°C. International Journal of Food Properties*, 9(1), 99-107. <https://doi.org/10.1080/10942910500473962>
- 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(5), 857-863. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01761.x>
- Cosgrove, S. E., Sakoulas, G., Perencevich, E. N., Schwaber, M. J., Karchmer, A. W., y Carmeli, Y. (2003). *Comparison of Mortality Associated with Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Bacteremia: A Meta-analysis. Clinical Infectious Diseases*, 36(1), 53-59. <https://doi.org/10.1086/345476>
- da Silva, C. I., Aazza, S., Faleiro, M. L., Miguel, M. da G., y Neto, L. (2016). Propiedades antibacterianas, anti-biofilm, anti-inflamatorias y de inhibición de la virulencia de mieles portuguesas. *Journal of Apicultural Research*, 55(4), 292-304. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1243294>
- Darboe, S., Dobreniecki, S., Jarju, S., Jallow, M., Mohammed, N. I., Wathuo, M., ... Secka, O. (2019). *Prevalence of Panton-Valentine Leukocidin (PVL) and Antimicrobial Resistance in Community-Acquired Clinical Staphylococcus aureus in an Urban Gambian Hospital: A 11-year period retrospective pilot study. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00170>
- Davey, M. E., Caiazza, N. C., y O'Toole, G. A. (2003). *Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in Pseudomonas aeruginosa PAO1. Journal of bacteriology*, 185(3), 1027-1036. <https://doi.org/10.1128/jb.185.3.1027-1036.2003>
- De Beer, D., Srinivasan, R., y Stewart, P. S. (1994). *Direct measurement of chlorine*

- penetration into biofilms during disinfection. Applied and environmental microbiology*, 60(12), 4339-4344. Recuperado el 25 de octubre de 2019 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7811074>
- Dickinson, G. M., y Bisno, A. L. (1993). *Infections associated with prosthetic devices: clinical considerations. The International journal of artificial organs*, 16(11), 749-754. Recuperado el 26 de octubre de 2019 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8150520>
- Donlan, R. M. (2002). *Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Diseases. Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Dustmann, J. H. (1979). *Antibacterial Effect of Honey. En Apiacta (Vol. 1)*. Recuperado el 27 de octubre de 2019 de <http://fiitea.org/foundation/apitherapy/DUSTMANNen.pdf>
- Escriche, I., Visquert, M., Carot, J. M., Doménech, E., y Fito, P. (2008). *Effect of Honey Thermal Conditions on Hydroxymethylfurfural Content Prior to Pasteurization*. <https://doi.org/10.1177/1082013208094580>
- Eteraf-Oskouei, T., y Najafi, M. (2013). *Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: a review. Iranian journal of basic medical sciences*, 16(6), 731-742.
- Flemming, H. C., y Wingender, J. (2010, septiembre). *The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology*, Vol. 8, pp. 623-633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- García-Tenesaca, M., Navarrete, E. S., Iturralde, G. A., Villacrés Granda, I. M., Tejera, E., Beltrán-Ayala, P., ... Álvarez-Suarez, J. M. (2017). *Influence of Botanical Origin and Chemical Composition on the Protective Effect against Oxidative Damage and the Capacity to Reduce In Vitro Bacterial Biofilms of Monofloral Honeys from the Andean Region of Ecuador. International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 45. <https://doi.org/10.3390/ijms19010045>
- Gheldof, N., Wang, X.-H., y Engeseth, N. J. (2002). *Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5870-5877.

- <https://doi.org/10.1021/jf0256135>
- Gilbert, P., Das, J., y Foley, I. (1997). *Biofilm Susceptibility to Antimicrobials. Advances in Dental Research*, 11(1), 160-167. <https://doi.org/10.1177/08959374970110010701>
- Gnanadhas, D. P., Elango, M., Datey, A., y Chakravortty, D. (2015). *Chronic lung infection by Pseudomonas aeruginosa biofilm is cured by L-Methionine in combination with antibiotic therapy. Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep16043>
- Gould, I. M., Cauda, R., Esposito, S., Gudiol, F., Mazzei, T., y Garau, J. (2011). *Management of serious meticillin-resistant Staphylococcus aureus infections: What are the limits? International Journal of Antimicrobial Agents*, Vol. 37, pp. 202-209. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.10.030>
- Grandis, A., Godoi, S., y Buckeridge, M. S. (2010). *Physiological responses of amazonian flooded plants to the global climate change. Revista Brasileira de Botanica*, 33(1), 1-12. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042010000100002>
- Hadagali, M. D., y Chua, L. S. (2014). *The anti-inflammatory and wound healing properties of honey. European Food Research and Technology*, 239(6), 1003-1014. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2297-6>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., y Stoodley, P. (2004). *Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95-108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Hamdan, K. (2010). *Crystallization of Honey. Bee World*, 87(4), 71-74. <https://doi.org/10.1080/0005772x.2010.11417371>
- He, J., Hwang, G., Liu, Y., Gao, L., Kilpatrick, L., Santarpi, P., ... Koo, H. (2016). *L-arginine modifies the exopolysaccharide matrix and thwarts Streptococcus mutans outgrowth within mixed-species oral biofilms. Journal of Bacteriology*, 198(19), 2651-2661. <https://doi.org/10.1128/JB.00021-16>
- Isiklar, Z. U., Darouiche, R. O., Landon, G. C., y Beck, T. (1996). *Efficacy of antibiotics alone for orthopaedic device related infections. Clinical orthopaedics and related research*, (332), 184-189. Recuperado el 28 de octubre de 2019 de

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8913162>

- Jagani, S., Chelikani, R., y Kim, D. S. (2009). *Effects of phenol and natural phenolic compounds on biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling*, 25(4), 321-324. <https://doi.org/10.1080/08927010802660854>
- Jahan, N., Islam, M. A., Alam, F., Gan, S. H., y Khalil, M. I. (2015). *Prolonged heating of honey increases its antioxidant potential but decreases its antimicrobial activity*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 12(4), 134-144. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v12i4.20>
- Jeffrey, A. (1996). *Medical uses of honey*. Recuperado el 29 de octubre de 2019 de <https://www.researchgate.net/publication/242582595>
- Jenkins, R., Burton, N., y Cooper, R. (2011a). *Effect of manuka honey on the expression of universal stress protein A in meticillin-resistant Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(4), 373-376. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.11.036>
- Jenkins, R., Burton, N., y Cooper, R. (2011b). *Manuka honey inhibits cell division in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(11), 2536-2542. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr340>
- Karatan, E., y Watnick, P. (2009). *Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 73(2), 310-347. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00041-08>
- Kilty, S. J., Duval, M., Chan, F. T., Ferris, W., y Slinger, R. (2011). *Methylglyoxal: (active agent of manuka honey) in vitro activity against bacterial biofilms*. *International Forum of Allergy & Rhinology*, 1(5), 348-350. <https://doi.org/10.1002/alr.20073>
- Konopka, A. (2009). *What is microbial community ecology*. *ISME Journal*, 3(11), 1223-1230. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.88>
- Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P., y Hall-Stoodley, L. (2017, diciembre 1). *Targeting microbial biofilms: Current and prospective therapeutic strategies*. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 15, pp. 740-755. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.99>

- Kumar, C. P., y Menon, T. (2006). *Biofilm production by clinical isolates of Candida species*. *Medical Mycology*, 44(1), 99-101. <https://doi.org/10.1080/13693780500338084>
- Kwakman, P., Van den Akker, J., Güçlü, A., Aslami, H., Binnekade, J., de Boer, L., ... Zaat, S. (2008). *Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria in vitro and eradicates skin colonization*. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46(11), 1677-1682. <https://doi.org/10.1086/587892>
- Kwakman, P., y Zaat, S. (2012). *Antibacterial components of honey*. *IUBMB life*, 64(1), 48-55. <https://doi.org/10.1002/iub.578>
- Lin, M. H., Shu, J. C., Huang, H. Y., y Cheng, Y. C. (2012). *Involvement of iron in biofilm formation by staphylococcus aureus*. *PLOS ONE*, 7(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034388>
- López, D., Vlamakis, H., y Kolter, R. (2010, julio 1). *Biofilms*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, Vol. 2. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000398>
- Louveaux, J., Maurizio, A., y Vorwohl, G. (1978). *Methods of Melissopalynology*. *Bee World*, 59(4), 139-157. <https://doi.org/10.1080/0005772x.1978.11097714>
- Lu, J., Cokcetin, N. N., Burke, C. M., Turnbull, L., Liu, M., Carter, D. A., ... Harry, E. J. (2019). *Honey can inhibit and eliminate biofilms produced by Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54576-2>
- Lu, J., Turnbull, L., Burke, C. M., Liu, M., Carter, D. A., Schlothauer, R. C., ... Harry, E. J. (2014). *Manuka-type honeys can eradicate biofilms produced by Staphylococcus aureus strains with different biofilm-forming abilities*. 1-25. <https://doi.org/10.7717/peerj.326>
- Maddocks, S. E., Lopez, M. S., Rowlands, R. S., y Cooper, R. A. (2012). *Manuka honey inhibits the development of Streptococcus pyogenes biofilms and causes reduced expression of two fibronectin binding proteins*. *Microbiology*, 158(Pt_3), 781-790. <https://doi.org/10.1099/mic.0.053959-0>
- Mah, T.-F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G. C., Stewart, P. S., y O'Toole, G. A.

- (2003). *A genetic basis for Pseudomonas aeruginosa biofilm antibiotic resistance. Nature*, 426(6964), 306-310. <https://doi.org/10.1038/nature02122>
- Mama, M., Teshome, T., y Detamo, J. (2019). *Antibacterial Activity of Honey against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: A Laboratory-Based Experimental Study. International Journal of Microbiology*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7686130>
- McLoone, P., Warnock, M., y Fyfe, L. (2016). *Honey: A realistic antimicrobial for disorders of the skin. Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 49(2), 161-167. <https://doi.org/10.1016/J.JMII.2015.01.009>
- Moffett, D. B., El-Masri, H. A., y Fowler, B. A. (2007). *General considerations of dose-effect and dose-response relationships. En Handbook on the Toxicology of Metals* (pp. 101-115). <https://doi.org/10.1016/B978-012369413-3/50061-6>
- Moradali, M. F., Ghods, S., y Rehm, B. H. A. (2017, febrero 15). *Pseudomonas aeruginosa lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Vol. 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>
- Morrone, G., Álvarez-Suarez, J. M., Brenciani, A., Simoni, S., Fioriti, S., Pugnali, A., ... Giovanetti, E. (2018). *Comparison of the Antimicrobial Activities of Four Honeys From Three Countries (New Zealand, Cuba, and Kenya). Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01378>
- Nickel, J. C., Ruseska, I., Wright, J. B., y Costerton, J. W. (1985). *Tobramycin resistance of Pseudomonas aeruginosa cells growing as a biofilm on urinary catheter material. Antimicrobial agents and chemotherapy*, 27(4), 619-624. Recuperado el 30 de octubre de 2019 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3923925>
- Nicolle, L. E. (2014). *Catheter associated urinary tract infections. Antimicrobial resistance and infection control*, 3, 23. <https://doi.org/10.1186/2047-2994-3-23>
- Nikolaev, Y. A., y Plakunov, V. K. (2007). *Biofilm "City of microbes" or an analogue of multicellular organisms? Microbiology*, 76(2), 125-138. <https://doi.org/10.1134/S0026261707020014>

- Nishio, E. K., Ribeiro, J. M., Oliveira, A. G., Andrade, C. G. T. J., Proni, E. A., Kobayashi, R. K. T., y Nakazato, G. (2016). *Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: Scaptotrigona bipunctata Lepeletier, 1836, and S. postica Latreille, 1807. Scientific Reports, 6.* <https://doi.org/10.1038/srep21641>
- Oglesby-Sherrouse, A. G., Djapgne, L., Nguyen, A. T., Vasil, A. I., y Vasil, M. L. (2014). *The complex interplay of iron, biofilm formation, and mucoidy affecting antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosa. Pathogens and Disease, 70(3), 307-320.* <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12132>
- Olaitan, P. B., Adeleke, O. E., y Ola, I. O. (2007). *Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. African health sciences, 7(3), 159-165.* <https://doi.org/10.5555/afhs.2007.7.3.159>
- OMS. (2017, febrero 27). *La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos.*
- Oro, D., Heissler, A., Rossi, E. M., Scapin, D., Da Silva Malheiros, P., y Boff, E. (2015). *Antifungal activity of natural compounds against Candida species isolated from HIV-positive patients. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 5(9), 781-784.* <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.07.011>
- Ozekinci, T., Dal, T., Yanı, K., Ozcan, N., Can, S., Tekin, A., ... Kandemir, I. (2014). *Panton-valentine leukocidin in community and hospital-acquired staphylococcus aureus strains. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 28(6), 1089-1094.* <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.976457>
- Pfeiffer, P., Bonilla, D., y Parra, G. (2014). *Catálogo de polen en mieles de Apis mellifera provenientes de zonas cafeteras en la Sierra Nevada de Santa Marta, Magdalena, Colombia. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 38(149), 364.* <https://doi.org/10.18257/raccefyn.61>
- Pimentel-González, D. J., Basilio-Cortes, U. A., Hernández-Fuentes, A. D., Figueira, A. C., Quintero-Lira, A., y Campos-Montiel, R. G. (2017). *Effect of Thermal Processing on Antibacterial Activity of Multifloral Honeys. Journal of Food*

- Process Engineering*, 40(1). <https://doi.org/10.1111/jfpe.12279>
- Pimentel, R. B. de Q., da Costa, C. A., Albuquerque, P. M., y Junior, S. D. (2013). *Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee Melipona compressipes manaosensis and commercial honey. BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 151. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-151>
- Pleuvry, B. J. (2004). *Receptors, agonists and antagonists. Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 5(10), 350-352. <https://doi.org/10.1383/anes.5.10.350.52312>
- Pratt, L., y Kolter, R. (1999). *Genetic analyses of bacterial biofilm formation*. Boston.
- Purrello, S. M. M., Garau, J., Giamarellos, E., Mazzei, T., Pea, F., Soriano, A., y Stefani, S. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections: A review of the currently available treatment options.* , 7 *Journal of Global Antimicrobial Resistance* § (2016).
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., y Jaziri, M. El. (2015). *The Formation of Biofilms by Pseudomonas aeruginosa: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms*. <https://doi.org/10.1155/2015/759348>
- Rasigade, J.-P., Laurent, F., Lina, G., Meugnier, H., Bes, M., Vandenesch, F., ... Tristan, A. (2010). *Global distribution and evolution of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-susceptible Staphylococcus aureus, 1981-2007. The Journal of infectious diseases*, 201(10), 1589-1597. <https://doi.org/10.1086/652008>
- Sandrin, T. R., Dowd, S. E., Herman, D. C., y Maier, R. M. (2009). *Aquatic Environments. En Environmental Microbiology* (pp. 103-122). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00006-7>
- Semprini, A., Singer, J., Braithwaite, I., Shortt, N., Thayabaran, D., Mcconnell, M., ... Beasley, R. (2019). *Kanuka honey versus aciclovir for the topical treatment of herpes simplex labialis: a randomised controlled trial. BMJ Open*. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-026201>

- Sepehr, S. (2010). *The most important medicinal uses of honey, and its side effects in the book of the Canon by Avicenna, and in the modern medical literature: a comparative study*. *ApiProd ApiMed Sci*.
- Shallcross, L. J., Fragaszy, E., Johnson, A. M., y Hayward, A. C. (2013). *The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis*. *The Lancet. Infectious diseases*, 13(1), 43-54. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70238-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70238-4)
- Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., Power, A., Gethin, G., Cowman, S., y Humphreys, H. (2010). *Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1), 47. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-47>
- Shin, J. H., Kee, S. J., Shin, M. G., Kim, S. H., Shin, D. H., Lee, S. K., ... Ryang, D. W. (2002). *Biofilm production by isolates of Candida species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources*. *Journal of clinical microbiology*, 40(4), 1244-1248. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.4.1244-1248.2002>
- Simon, A., Traynor, K., Santos, K., Blaser, G., Bode, U., y Molan, P. (2009). *Medical honey for wound care still the «latest resort»? Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 6(2), 165-173. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem175>
- Sindi, A., Chawn, M. V. B., Hernandez, M. E., Green, K., Islam, M. K., Locher, C., y Hammer, K. (2019). *Anti-biofilm effects and characterisation of the hydrogen peroxide activity of a range of Western Australian honeys compared to Manuka and multifloral honeys*. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54217-8>
- Skoog, D. A., y West, D. M. (2015). *Química Analítica* (9.^a ed.). Recuperado el 31 de octubre de 2019 de <http://latinoamerica.cengage.com>
- Sonesson, A., Przybyszewska, K., Eriksson, S., Mörgelin, M., Kjellström, S., Davies, J., ... Schmidtchen, A. (2017). *Identification of bacterial biofilm and the*

- Staphylococcus aureus* derived protease, staphopain, on the skin surface of patients with atopic dermatitis. *Scientific Reports*, 7(1), 8689. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08046-2>
- Sousa, M. S., Morais Vieira, L., y de Lima, A. (2011). Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. *Brazilian Journal of Food Technology*, 14(03), 202-210. <https://doi.org/10.4260/bjft2011140300024>
- Stephens, J. M., Schlothauer, R. C., Morris, B. D., Yang, D., Fearnley, L., Greenwood, D. R., y Loomes, K. M. (2010). Phenolic compounds and methylglyoxal in some New Zealand manuka and kanuka honeys. *Food Chemistry*, 120(1), 78-86. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.074>
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., y Costerton, J. W. (2002). Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 187-209. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>
- Stryjewski, M. E., y Corey, G. R. (2014). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 58 Suppl 1, S10-9. <https://doi.org/10.1093/cid/cit613>
- Sutherland, I. W. (2001a). Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. *Microbiology*, Vol. 147, pp. 3-9. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-1-3>
- Sutherland, I. W. (2001b). The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology*, 9(5), 222-227. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(01\)02012-1](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(01)02012-1)
- Tappi, S., Laghi, L., Dettori, A., Piana, L., Ragni, L., y Rocculi, P. (2019). Investigation of water state during induced crystallization of honey. *Food Chemistry*, 294, 260-266. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.047>
- Tosi, E. A., Lucero, H., y Bulacio, L. (2004). Effect of honey high-temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallisation phenomena and fungal inhibition. 37, 669-678. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.02.005>

- Vail, G. (2006). *The Maya Codices. Annual Review of Anthropology*, 35(1), 497-519. <https://doi.org/10.1146/annurev.anthro.35.081705.123324>
- Valdés-Silverio, L. A., Iturralde, G., García-Tenesaca, M., Paredes-Moreta, J., Narváez-Narváez, D. A., Rojas-Carrillo, M., ... Álvarez-Suarez, J. M. (2018). *Physicochemical parameters, chemical composition, antioxidant capacity, microbial contamination and antimicrobial activity of Eucalyptus honey from the Andean region of Ecuador. Journal of Apicultural Research*, 57(3), 382-394. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1426349>
- Vasu, D., Sunitha, M. M., Srikanth, L., Swarupa, V., Prasad, U. V., Sireesha, K., ... Sarma, P. V. G. K. (2015). *In Staphylococcus aureus the regulation of pyruvate kinase activity by serine/threonine protein kinase favors biofilm formation. 3 Biotech*, 5(4), 505-512. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0248-3>
- Venir, E., Spaziani, M., y Maltini, E. (2010). *Crystallization in «Tarassaco» Italian honey studied by DSC. Food Chemistry*, 122(2), 410-415. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.012>
- Vergères, P., y Blaser, J. (1992). *Amikacin, ceftazidime, and flucloxacillin against suspended and adherent Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis in an in vitro model of infection. The Journal of infectious diseases*, 165(2), 281-289. Recuperado el 11 de octubre de 2019 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1730894>
- Vess, R. W., Anderson, R. L., Carr, J. H., Bond, W. W., y Favero, M. S. (1993). *The colonization of solid PVC surfaces and the acquisition of resistance to germicides by water micro-organisms. The Journal of applied bacteriology*, 74(2), 215-221. Recuperado el 13 de octubre de 2019 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8444652>
- Von Der Ohe, W., Persano Oddo, L., Piana, M. L., Morlot, M., y Martin, P. (2004). *Harmonized methods of melissopalynology. Apidologie*, 35(Suppl. 1), S18-S25. <https://doi.org/10.1051/apido:2004050>
- Watanabe, K., Rahmasari, R., Matsunaga, A., Haruyama, T., y Kobayashi, N. (2014). *Anti-influenza viral effects of honey in vitro: potent high activity of*

- manuka honey. Archives of medical research*, 45(5), 359-365.
<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.05.006>
- Watnick, P., y Kolter, R. (2000, mayo). *Biofilm, city of microbes. Journal of Bacteriology*, Vol. 182, pp. 2675-2679. <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000>
- Zamora, L. G., Beukelman, C. J., van den Berg, A. J. J., Aerts, P. C., Quarles van Ufford, H. C., Nijland, R., y Arias, M. L. (2017). *An insight into the antibiofilm properties of Costa Rican stingless bee honeys. Journal of Wound Care*, 26(4), 168-177. <https://doi.org/10.12968/jowc.2017.26.4.168>
- Zmantar, T., Kouidhi, B., Miladi, H., Mahdouani, K., y Bakhrouf, A. (2010). *A Microtiter plate assay for Staphylococcus aureus biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation* (Vol. 33).
- Zoraghi, R., Worrall, L., See, R. H., Strangman, W., Popplewell, W. L., Gong, H., ... Reiner, N. E. (2011). *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) pyruvate kinase as a target for bis-indole alkaloids with antibacterial activities. Journal of Biological Chemistry*, 286(52), 44716-44725. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.289033>
- Zubaidah, H., Irfan, M., Azian, H., Rosdan, S., y Siti Amrah, S. (2018). *Antifungal effect of three local Malaysian honeys on selected pathogenic fungi of otomycosis: An in vitro Evaluation. Journal of Young Pharmacists*, 10(4), 414-417. <https://doi.org/10.5530/jyp.2018.10.91>

ANEXOS

Estadísticos descriptivos

Tabla 1.

Valores de % de actividad antimicrobiana en experimentos de inhibición en la formación de biopelículas bacterianas para mieles aplicadas sin tratamiento, con tratamiento a 45°C y a 60°C sobre *P. aeruginosa* (ATCC: 27853) y *P. aeruginosa* multirresistente (Código: P28).

% ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA									
Experimento	Microorganismo	Tratamiento térmico	Concentración de miel aplicada			Desv. Error			
			% Mínimo	% Máximo	Media(%)				
Inhibición de biopelículas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC:27853)	Sin tratamiento térmico	0%	0	0	0,0	0,0		
			5%	24	40	31,5	0,8		
			10%	27	43	35,9	0,8		
			15%	30	44	38,5	0,7		
			20%	32	50	42,7	0,7		
		45°C	0%	0	0	0,0	0,0		
			5%	4	33	19,4	1,3		
			10%	8	38	27,2	1,6		
			15%	13	41	32,0	1,3		
			20%	18	45	36,4	1,2		
		60°C	0%	0	0	0,0	0,0		
			5%	7	41	31,2	1,3		
			10%	12	37	26,9	1,2		
			15%	13	48	24,1	1,4		
			20%	2	31	14,8	1,3		
		Inhibición de biopelículas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente (P28)	Sin tratamiento térmico	0%	0	0	0,0	0,0
					5%	22	48	42,6	1,0
					10%	19	48	43,1	1,1
					15%	17	49	44,5	1,0
					20%	14	49	43,5	1,3
45°C	0%			0	0	0,0	0,0		
	5%			-5	20	8,6	1,1		
	10%			1	21	12,6	0,9		
	15%			6	23	16,6	0,9		
	20%			7	30	20,8	1,1		
60°C	0%			0	0	0,0	0,0		
	5%			-33	14	-4,3	2,6		
	10%			-32	14	-7,3	2,2		
	15%			-42	25	-7,3	2,7		
	20%			-37	16	-12,6	2,5		

Nota: Se usó un análisis One-Way ANOVA para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos utilizando una corrección de Bonferroni para su comparación múltiple. En todos los casos, un valor de p-value < 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo.

Tabla 2.

Valores de % de actividad antimicrobiana en experimentos de inhibición en la formación de biopelículas bacterianas para mieles aplicadas sin tratamiento, con tratamiento a 45°C y a 60°C sobre *S. aureus* ATCC: 25923 y *S. aureus* resistente a meticilina (Código: 333).

% ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA							
Experimento	Microorganismo	Tratamiento térmico	Concentración de miel aplicada	% Mínimo	% Máximo	Media(%) Desv. Error	
Inhibición de biopelículas	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC:25923)	Sin tratamiento térmico	0%	0	0	0,0 0,0	
			5%	14	48	31,7 1,7	
			10%	21	52	37,0 1,3	
			15%	27	53	40,4 1,1	
			20%	32	53	43,1 0,9	
		45°C	0%	0	0	0,0 0,0	
			5%	19	42	30,4 1,1	
			10%	26	49	37,1 1,1	
			15%	32	51	42,3 1,0	
			20%	33	52	45,0 0,9	
		60°C	0%	0	0	0,0 0,0	
			5%	23	43	35,4 0,8	
			10%	35	48	41,2 0,6	
			15%	35	49	43,6 0,7	
			20%	36	53	47,0 0,8	
		<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (Código:333)	Sin tratamiento térmico	0%	0	0	0,0 0,0
				5%	13	42	23,9 1,5
				10%	15	45	30,1 1,5
				15%	20	48	34,9 1,3
				20%	29	52	39,0 1,1
	45°C		0%	0	0	0,0 0,0	
			5%	17	42	29,8 1,1	
			10%	22	46	35,1 1,0	
			15%	24	47	38,1 1,0	
20%			27	48	40,1 1,1		
60°C	0%		0	0	0,0 0,0		
	5%		3	41	22,8 1,9		
	10%		3	43	23,1 2,0		
	15%		10	46	30,6 1,8		
		20%	15	48	37,2 1,5		

Nota: Se usó un análisis One-Way ANOVA para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos utilizando una corrección de Bonferroni para su comparación múltiple. En todos los casos, un valor de p-value < 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo.

Tabla 3.

Valores de % de actividad antimicrobiana en experimentos de rompimiento de biopelículas bacterianas preformadas para mieles aplicadas sin tratamiento, con tratamiento a 45°C y a 60°C sobre *P. aeruginosa* ATCC: 27853 y *P. aeruginosa* multirresistente (Código: P28).

% ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA							
Experimento	Microorganismo	Tratamiento térmico	Concentración de miel aplicada	% Mínimo	% Máximo	Media(%) Desv. Error	
Rompimiento de biopelículas preformadas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC:27853)	Sin tratamiento térmico	0%	0	0	0,0	
			5%	-8	11	0,5	
			10%	-6	25	4,9	
			15%	-6	30	9,5	
			20%	-2	43	18,9	
		45°C	0%	0	0	0,0	
			5%	-8	18	10,4	
			10%	-12	12	2,9	
			15%	-28	24	1,7	
			20%	-31	20	-5,8	
	60°C	0%	0	0	0,0		
		5%	11	40	29,8		
		10%	26	39	31,1		
		15%	19	38	33,3		
		20%	28	38	34,4		
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente (P28)	Sin tratamiento térmico	0%	0	0	0,0
				5%	-19	18	0,6
				10%	-17	18	1,3
				15%	-16	21	1,5
				20%	-11	20	5,8
45°C	0%		0	0	0,0		
	5%		-20	19	0,9		
	10%		-29	20	-1,7		
	15%		-22	23	0,8		
	20%		-28	26	1,0		
60°C	0%	0	0	0,0			
	5%	-24	13	-3,9			
	10%	-17	15	1,1			
	15%	-8	19	6,9			
	20%	-5	28	13,3			

Nota: Se usó un análisis One-Way ANOVA para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos utilizando una corrección de Bonferroni para su comparación múltiple. En todos los casos, un valor de p-value < 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo.

Tabla 4.

Valores de % de actividad antimicrobiana en experimentos de rompimiento en la formación de biopelículas bacterianas preformadas para mieles aplicadas sin tratamiento, con tratamiento a 45°C y a 60°C sobre *S. aureus* ATCC: 25923 y *S. aureus* resistente a meticilina (Código: 333).

% ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA						
Experimento	Microorganismo	Tratamiento térmico	Concentración de miel aplicada	% Mínimo	% Máximo	Media(%) Desv. Error
Rompimiento de biopelículas preformadas	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC:25923)	Sin tratamiento térmico	0%	0	0	0,0
			5%	-11	29	2,4
			10%	-11	34	6,0
			15%	-9	40	9,7
			20%	-3	50	15,3
		45°C	0%	0	0	0,0
			5%	-14	8	-4,4
			10%	-12	11	0,2
			15%	-6	19	6,1
			20%	3	23	11,4
	60°C	0%	0	0	0,0	
		5%	13	41	36,0	
		10%	32	43	38,1	
		15%	34	44	38,7	
		20%	33	46	39,4	
	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (Código:333)	Sin tratamiento térmico	0%	0	0	0,0
			5%	-6	31	10,7
			10%	-3	41	18,3
			15%	-1	53	26,5
			20%	3	50	32,6
45°C		0%	0	0	0,0	
		5%	-23	7	-2,0	
		10%	-28	4	-7,1	
		15%	-35	0	-12,5	
		20%	-42	-2	-18,9	
60°C	0%	0	0	0,0		
	5%	-4	45	19,2		
	10%	-15	40	11,8		
	15%	-22	31	4,7		
	20%	-26	26	0,0		

Nota: Se usó un análisis One-Way ANOVA para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos utilizando una corrección de Bonferroni para su comparación múltiple. En todos los casos, un valor de p-value < 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo.

