



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y ANTIFÚNGICAS  
DE LA MIEL DE ABEJA (*Apis mellifera*) COMO TRATAMIENTO DE  
INFECCIONES CAUSADAS *Clostridium perfringens*, *Pseudomona aeruginosa*,  
*Candida tropicalis* y *Aspergillus brasiliensis*.

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

Profesor Guía

Ph.D. José Miguel Álvarez Suarez

Autora

María Belén Vargas Rivadeneira

Año

2016

### **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante 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 Suarez

Ph.D.

C.I.: 1756653372

### **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.”

---

María Belén Vargas Rivadeneira

C.I.: 1714155882

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer a mi tutor el Dr. José Miguel Álvarez, por su dedicación, esfuerzo, paciencia, y motivación que han sido fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

De igual manera, agradezco al Msc. Luis Alberto Valdés, por su gran apoyo y comprensión.

Agradezco a las Universidad de las Américas y a la Universidad Politécnica, por su colaboración en este estudio.

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a mis padres, que han sido mi apoyo incondicional a lo largo de estos años, porque sin ellos, no estaría culminando mis estudios.

Sobre todo, gracias a mi madre por tus palabras de aliento que no me dejaron caer nunca.

A mis hermanos, por estar siempre conmigo.

## RESUMEN

La miel de abeja (*Apis Mellífera*) ha sido utilizada como un tratamiento para infecciones bacterianas e inclusive fúngicas, además de ser una alternativa barata en relación a los medicamentos tradicionales. Se busca esta opción debido al incremento de resistencia microbiana en los últimos años.

En el presente estudio se realizó con el objetivo establecer la capacidad antimicrobiana y antifúngica de mieles monoflorales de ñachag, nabo y flores tropicales ante *Clostridium perfringens*, *Pseudomona aeruginosa*, *Aspergillus brasiliensis* y *Candida tropicalis*.

Para esto se inoculó las cepas ATCC de los microorganismos de interés, en un medio sólido, al día siguiente se colocaron las mieles monoflorales a diferentes concentraciones y se procedió a la lectura de datos.

Según los datos obtenidos, las tres mieles monoflorales, en todas las concentraciones del 100%, 75%, 50%, 25%, entre las 8 -72 horas de incubación, presentan un efecto de inhibición sobre *P. aeruginosa* y *C. perfringens*, mientras que no mostraron ningún efecto de inhibición de crecimiento sobre la cepa del hongo *A. brasiliensis* y *C. tropicalis*, a ninguna concentración.

La miel, que presentó mayor halo de inhibición, a las concentraciones del 100%, 50% y 25% (a las 72 h), ante la cepa de *P. aeruginosa* fue la miel de ñachag; mientras que la miel de flores tropicales a una concentración del 25 %, presentó los mejores efectos inhibitorios, difiriendo significativamente ( $p \leq 0,05$ ), en comparación con el resto de las mieles.

## ABSTRACT

The honey of bees (*Apis mellifera*) has been used as a treatment for bacterial and even fungal infections, as well as a cheap alternative compared to traditional medicines. We search for this option due to the increased of microbial resistance in the recent years.

The present study was conducted to establish the antimicrobial and antifungal capacity of single-flower honeys from ñachag, turnip and tropical flowers against *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Aspergillus brasiliensis*.

For this the ATCC strains of microorganisms of interest were inoculated in a solid medium, the next day the monofloral honeys were placed at different concentrations and proceeded to read data.

According to the data, the three monofloral honeys, at all concentrations of 100%, 75%, 50%, 25% between 8 -72 hours of incubation, have an inhibitory effect on *P. aeruginosa* and *C. perfringens*, while showed no effect on growth inhibition of the fungus strain *A. brasiliensis* and *C. tropicalis*, at any concentration.

The honey, on which showed greater inhibition zone, at concentrations of 100%, 50% and 25% (at 72 h) before the *P. aeruginosa* strain was ñachag honey; meanwhile the honey of tropical flowers at a concentration of 25%, showed the best inhibitory effects, differing significantly ( $p \leq 0.05$ ) compared with the rest of the honeys.

# ÍNDICE

1. CAPITULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes .....	1
1.2 Justificación .....	3
1.3 Objetivos .....	4
1.3.1 Objetivo General .....	4
1.3.2 Objetivos específicos .....	5
1.4 Hipótesis.....	5
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. Características generales de la miel de abeja .....	6
2.2 Tipos de mieles .....	6
2.2.1 Miel de ñachag ( <i>Bidens triplinervia</i> ) .....	6
2.2.2 Miel de Nabo silvestre ( <i>Brassica rapa</i> ).....	6
2.2.3 Miel de flores tropicales ( <i>Laurus novilis</i> ) .....	7
2.3 Formas de obtención.....	7
2.3.1 Proceso de transformación del néctar en miel .....	7
2.3.2 Cosecha .....	8
2.3.3 Proceso de extracción.....	8
2.4 Composición química de la miel.....	8
2.5 Propiedades físicas de la miel de abeja .....	9
2.6 Propiedades biológicas y usos .....	10
2.7 Acción antimicrobiana de la miel de abeja.....	11
2.7.1 Peróxido de hidrógeno .....	11
2.7.2 Actividad antimicrobiana no peróxida.....	12
2.7.3 Propiedades antimicóticas .....	12
2.8 Efecto antiinflamatorio .....	13
2.9 Importancia económica.....	13
2.10 Producción de miel de abeja en ecuador.....	14

2.10.1 Producción de miel de abeja en las provincias de Pichincha y Bolívar.....	14
2.11 Microorganismos patógenos .....	15
2.11.1 Género clostridium .....	15
2.12. Género cándida.....	19
2.12.1. <i>Candida tropicalis</i> .....	19
2.12.1.1 Enfermedades y huéspedes causados por <i>Candida tropicalis</i> ....	20
2.13. <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	20
2.13.1. Mecanismo de acción.....	20
2.13.2. Infecciones clínicas .....	21
2.14. ASPERGILLUS .....	21
2.14.1 Mecanismos de acción.....	22
3. CAPITULO III. METODOLOGÍA.....	24
3.1 Ubicación geográfica.....	24
3.2 Diseño de estudio .....	26
3.3 Materiales .....	27
3.3.1 Materiales de laboratorio.....	27
3.4 Métodos.....	28
3.4.1 Cálculos para la preparación de medios .....	28
3.4.2 Preparación de los medios de cultivo.....	28
3.4.3 Preparación de los inóculos .....	29
3.4.4 Metodología para la dilución de las mieles.....	30
3.4.5 Medición de densidad .....	30
3.4.6 Test antibiótico de Kirby-Baeur e interpretación.....	32
3.4.7 Metodología para realizar los ponches.....	32
3.4.8 Metodología para la medición de halos.....	33
3.5. Análisis estadístico.....	33
4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS .....	34
4.1 Discusión.....	39
4.2. Conclusiones y recomendaciones .....	40

4.2.1 Conclusiones.....	40
4.2.2 Recomendaciones.....	41
10. REFERENCIAS .....	42
ANEXOS .....	48

## 1. CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

La alta incidencia de enfermedades infecciosas, el desconocimiento y falta de información de las mismas, han ocasionado que Ecuador, esté limitada en la producción y productividad pecuaria (Suarez, 1990, p. 52). Existen un grupo de microorganismos causantes de enfermedades infecciosas importantes que inciden en la producción pecuaria y medicina veterinaria, por ejemplo: *Clostridium perfringens*, *Pseudomona aeruginosa*, *Candida tropicalis* y *Aspergillus brasiliensis*.

*Clostridium perfringens*; es una bacteria *gram-positiva*, que ocasiona procesos infecciosos del sistema digestivo; esta se puede clasificar en *Clostridium perfringens* de tipo A, B, C y D y *épsilon*. La bacteria produce *enterotoxemias agudas*, generando intoxicaciones letales en terneros, lechones, corderos, ovejas, y en ciertas ocasiones en potros (Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, 2013, p. 229).

*Pseudomona aeruginosa*, por otra parte, es una bacteria gram-negativa, que llega a ser patógena generalmente después de una enfermedad primaria, inmunodeficiencia o el desbalance de la microbiota normal del animal causado a su vez por el uso de terapia con antibióticos (Quinn, P., Markey, B., Leonard, F., FitzPatrick, E. y Fanning, 2015, p. 62).

Este patógeno está asociado a enfermedades como mastitis en el ganado bovino y ovino, infecciones respiratorias en los porcinos, otitis externas, neumonía e infecciones post operación en caninos y felinos (Quinn et al., 2015, p. 62).

Las levaduras del género *Candida* y la especie *Candida tropicalis* es la responsable de la mayor cantidad de mastitis en el ganado bovino. Los principales síntomas son: inflamación, fiebre, pérdida considerable en la

producción de leche, y aumento en la cantidad de leucocitos en la leche (Samata, 2015).

La especie *Aspergillus brasiliensis*, si bien es un hongo saprofito, se encuentra asociado a un importante número de patologías en los animales; por ejemplo, en el ganado bovino, produce aborto, neumonía y mastitis micótica. En el caso de los caninos, desencadena otitis, aspergilosis nasal, y en felinos provoca aspergilosis sistémica (Quinn et al., 2015, p. 427).

En la actualidad, la medicina enfrenta fenómenos de biorresistencia como causa del uso indiscriminado de agentes terapéuticos, como antibióticos y antifúngicos. Ante esta situación, se hace necesaria la búsqueda de soluciones que contrarresten este efecto y frenen su desarrollo. En este sentido, la búsqueda de compuestos naturales con acción antimicrobiana ha despertado el interés de las actuales investigaciones científicas en este campo.

Uno de los productos naturales que ha llamado la atención de los investigadores ha sido la miel de abeja. La miel de abeja ha sido utilizada en la medicina natural desde la antigüedad. Este producto ha demostrado capacidad para actuar como barrera contra las infecciones, resultando, una terapia alternativa en la lucha contra la resistencia bacteriana y el uso indiscriminado de antibióticos, siendo además un remedio casero, seguro, y de fácil acceso (Kwakman, P., Zaat, 2012, p. 1).

Se ha demostrado que el efecto antimicrobiano de la miel de abeja está dado por ciertos factores químico-físicos en su constitución (Israili, 2014), dentro de los que podemos destacar:

- Su bajo pH.
- Su alta concentración de azúcar.
- La presencia de factores bacteriostáticos y bactericidas.
- Por su efecto osmótico.
- El aumento de liberación de citoquinas.

- Por sus características de inmunoregulación y antiinflamación.

Pese a las extraordinarias propiedades de la miel; la investigación de éste producto, se dejó de lado debido grandes avances en la medicina occidental, sin embargo, en la actualidad se ha retomado con gran fuerza y se continua con el estudio como una alternativa inapreciable y escasamente explotada (Kwakman, P., Zaat, 2012, p. 1).

## **1.2 Justificación**

Este estudio es de trascendental importancia, ya que responde a la necesidad actual de buscar alternativas efectivas y económicas para dar respuesta a un problema grave a nivel mundial, como es el caso de la resistencia microbiana. Según informa la OMS, en el año 2014, la resistencia ya no es un problema a futuro, sino que es una realidad constante. Igualmente, esta resistencia ha provocado que los actuales tratamientos y medidas de control contra ciertas enfermedades ya no sean eficaces (OMS, 2015, p. 1). Por ende, la OIE en acción conjunta con la OMS, han propuesto un grupo de medidas con el objetivo de fortalecer la capacitación en el uso de agentes antimicrobianos, regular la venta de antibióticos y sobretodo en el desarrollo de investigaciones para dar una alternativa al uso indiscriminado o poco efectivo de los antimicrobianos (OIE, 2013, pp. 1–2); como respuesta a esta situación, la miel de abeja ha sido señalada como un compuesto eficaz y que responde a estos intereses.

En la actualidad en Ecuador no se cuenta con la información necesaria sobre las propiedades biológicas de la miel de producción nacional. Las propiedades antioxidantes y antimicrobianas, son los efectos biológicos más destacados de este producto, que en su mayor parte se deben gracias a su alta osmolaridad, acidez, composición fitoquímica y la presencia de componentes como el peróxido de hidrógeno, péptidos bioactivos, entre otros ( Alvarez-Suarez et al., 2010).

Por otro lado, Ecuador cuenta con una alta capacidad para la producción apícola, según Agrocalidad – MAGAP se espera que dentro de unos años el país crezca y sea uno de los mayores productores de miel a nivel de Sudamérica (MAGAP, 2014), donde en la actualidad, según el catastro apícola del 2016 ya se cuenta con 21595 colmenas en todo el país. De esta manera, este proyecto busca promover y justificar científicamente el uso de la miel de abeja como alternativa a tratamientos contra patógenos de interés veterinario.

Se debe tomar en cuenta, que las propiedades antimicrobianas y antifúngicas de la miel, pueden ser de mucha ayuda para la industria de alimentos, logrando su preservación. Por ejemplo, con el uso de la miel se ha comprobado que ayuda a inhibir el crecimiento de bacterias oportunistas en la leche (Kwakman et al., 2011). Su uso se justifica además económicamente ya que la miel de abeja constituye una opción asequible y económica, además de ser una alternativa natural, con beneficios múltiples; la implementación de su uso ayudaría para que los microempresarios creen pequeños negocios de apicultura: como una alternativa de fuentes de trabajo y productivas (FAO, s.f.).

Por todo lo antes planteados este proyecto buscó determinar el efecto antimicrobiano y antifúngico de mieles de abeja de diferentes orígenes florales ante *Clostridium perfringens*, *Pseudomona aeruginosa*, *Aspergillus brasiliensis* y *Candida tropicalis*, ya que los mismos representan un grupo de agentes patógenos asociados a un grupo de patologías de importancia en medicina veterinaria.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo General**

Establecer la capacidad antimicrobiana y antifúngica de mieles monoflorales de ñachag, nabo y flores tropicales ante *Clostridium perfringens*, *Pseudomona aeruginosa*, *Aspergillus brasiliensis* y *Candida tropicalis*.

### 1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar la capacidad antimicrobiana y antifúngica de las mieles en estudio.
- Establecer una correlación entre el origen floral y las propiedades antimicrobianas y antifúngicas de las mieles estudiadas.

### 1.4 Hipótesis

Las mieles de abeja de (*Apis melífera*) de la floración de ñachag, nabo silvestre, y flores tropicales, presenta un efecto inhibitorio sobre el crecimiento y proliferación de los agentes patógenos con interés veterinario *Clostridium perfringens*, *Pseudomona aeruginosa*, *Aspergillus brasiliensis* y *Candida tropicalis*.

## 2. CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1. Características generales de la miel de abeja

La miel de abeja, es un producto complejo que está compuesto por una mezcla de carbohidratos, minerales, ácidos orgánicos, vitaminas, enzimas, y pigmentos (Carvalho et al., 2009, p. 1). Es una sustancia natural de consistencia viscosa, reconocida por su alta palatabilidad, producida a por las abejas a partir del néctar de las flores (Miel de Néctar) o secreciones de partes de las plantas (Mielada). El proceso mediante el cual las abejas transforman el néctar a miel es complejo, sin embargo, se puede decir que las abejas son las encargadas de recolectar y madurar el néctar, donde luego a través de una digestión enzimática parcial dentro de estómago de ellas, la depositan en pequeñas celdas de la colmena donde por último sufre el proceso de maduración (Mijanur Rahman, Gan, y Khalil, 2014, p. 1).

### 2.2 Tipos de mieles

#### 2.2.1 Miel de ñachag (*Bidens triplinervia*)

Es un tipo de miel producida por las abejas que absorben del néctar de las flores de ñachag. Las floraciones predominantes de esta flor se ubican al norte de Quito, en las parroquias de San Antonio de Pichincha y Calacalí. Este tipo de flor ha sido asociada con diversas propiedades antiinflamatorias, antiespasmódicas, además de ser útil en el tratamiento de flatulencias y cólicos (PFAF, s.f.). El período de cosecha de esta miel es en los meses junio y julio, y se caracteriza por poseer un color amarillo, con un ligero aroma floral y con consistencia cremosa (Apireal, s.f.).

#### 2.2.2 Miel de Nabo silvestre (*Brasiica rapa*)

Es producida a partir del néctar de las flores silvestres de nabo. Las principales floraciones de esta planta se ubican en el cantón Chillanes de la provincia de

Bolívar. Los principales beneficios medicinales asociados a esta planta son sus propiedades antianémicas, diuréticas, antioxidantes, además de contener gran cantidad de ácido fólico (Botanical-Online, s.f.). Esta miel se cosecha en los meses de junio y julio, y se caracteriza por presentar una coloración blanquecina, con una consistencia granulada, con un suave aroma floral (Apireal, s.f.).

### **2.2.3 Miel de flores tropicales (*Laurus novilis*)**

Esta miel se produce a partir del néctar de flores de verbena, laurel y otras especies propias de las zonas tropicales del Ecuador. Estas flores le brindan características altamente energizantes, diuréticas, expectorantes, antiartríticas, y hepatoprotectoras (Botanical-Online,s.f.). Los meses de cosecha de esta miel son en junio y julio. Estas mieles se caracterizan mayormente por presentar un típico sabor a cítrico y presentar una coloración dorada (Real, s.f.).

## **2.3 Formas de obtención**

### **2.3.1 Proceso de transformación del néctar en miel**

Las abejas poseen una estructura llamada proboscito, es decir una especie de lengua, que es encargada de succionar el néctar que se encuentra dentro del centro de la flor. El néctar se almacenará en el estómago, hasta que la abeja pueda llegar a la colmena. Durante todo este viaje, convertirán el néctar en un azúcar simple con la ayuda de enzimas y proteínas. Dentro de la colmena, la abeja pasará este azúcar hacia otra abeja obrera, la cual masticará esta sustancia para combinar el aire con el néctar, de esta manera reducirá el contenido de agua. Este proceso dura alrededor de 20 minutos. A continuación, las abejas tapan las celdas de la colmena con cera y la dejan como comida para el invierno (Mackenzie, 2013).

### **2.3.2 Cosecha**

La miel de abeja, puede ser cosechada de la colmena sin romper la colonia. El procesamiento de la miel consiste en retirar un segmento de la estructura de la colmena, mientras que los apicultores usan humo para calmar a las abejas (Motarjemi y Lelieveld, 2013, p. 284).

### **2.3.3 Proceso de extracción**

Para extraer la miel de los marcos de la colmena, se usa un cuchillo caliente para cortar la capa de cera. Una vez liberada toda la cera, se usa un extractor. Este consiste en una serie de tambores giratorios que ejercen fuerza para que la miel líquida salga de las celdas. Después de la extracción, la miel se filtra mediante un tamiz a un envase (Mackenzie, 2013).

Los tipos de miel serán clasificados de acuerdo al tipo de empaquetamiento y proceso:

- Miel cristalizada: En donde el contenido de glucosa, se cristaliza.
- Miel pasteurizada: Se calienta o pasteuriza a 71 C°, o más.
- Miel cruda: Se cosecha la miel, sin ningún tipo de procesamiento o extracción.
- Miel líquida: Pasa a través de una malla para eliminar cualquier material. (Motarjemi y Lelieveld, 2013, p. 284)

## **2.4 Composición química de la miel**

La composición de la miel de abeja dependerá de diversas variables como es el origen floral, el medio ambiente y la forma en la que esta sea procesada (Boukraa, 2013, p. 381). Se caracteriza por ser una solución acuosa de azúcar invertido, que contiene una mezcla compleja de enzimas, carbohidratos, ácidos orgánicos y aminos, pigmentos, ceras, etc. (Beliz, Grosh, Schieberle, 2004, p. 885).

Los carbohidratos son los componentes principales constituyendo cerca del 95% de su peso seco total (Boukraa, 2013, p. 381) donde los más predominantes son la fructosa y la glucosa. Cabe señalar que la composición de carbohidratos de la miel está directamente relacionada de su origen floral (Beliz et al, 2004, p. 885).

El porcentaje de humedad que normalmente posee es del 20%, sin embargo, si esta llega a tener un porcentaje mayor, la miel puede fermentarse. En cuanto a las enzimas, las más comunes son la alfa y beta amilasas, glucosa oxidasa y la alfa glucosidasa (Beliz et al, 2004). La glucosa oxidasa y catalasa son las enzimas precursoras del peróxido de hidrógeno, compuesto fundamental en las propiedades antimicrobianas de la miel (Manyi-Loh, Clarke y Ndip, 2011, p. 845).

Dentro de los compuestos minoritarios de la miel se encuentran aminoácidos, aproximadamente 18 tipos, así como vitaminas y minerales, que dependerán expresamente de su origen floral (Manyi-Loh et al, 2011, p. 845).

## 2.5 Propiedades físicas de la miel de abeja

Las principales propiedades físicas de la miel de abeja se relacionan con su densidad, pH, color, conductividad eléctrica y la higroscopicidad.

- **Densidad:** La miel fresca presenta una densidad viscosa. La diferencia entre viscosidad se da al aumentar la temperatura, favoreciendo la cristalización. La densidad de la miel de abeja puede variar de 1.38 a 1.45 g/cm<sup>3</sup>. Además, una característica física es que la miel una vez que se liquidifica, normalmente no vuelve a realizarse la recristalización (Tomasik, 2003, p. 74).
- **pH:** El promedio del pH de la miel es de 3.9, y el rango promedio es de 3.4 a 6.1 (National Honey Board, 2016).
- **Color:** El color se puede clasificar en 7 tipos: Blanco agua, extra blanco, blanco, ámbar extra claro, ámbar claro, ámbar y ámbar oscuro.

Tabla 1. Clasificación de la miel por color

<b>Nombre del Color</b>	<b>Escala Pfund (mm)</b>	<b>Densidad óptica</b>	
<b><i>Blanco agua</i></b>	<8	0,0945	
<b><i>Extra Blanco</i></b>	9-17	0,189	
<b><i>Blanco</i></b>	18-34	0,378	
<b><i>Ámbar extra claro</i></b>	35-50	0,378	
<b><i>Ámbar claro</i></b>	51-85	0,595	
<b><i>Ámbar</i></b>	86-114	1,389	
<b><i>Ámbar obscuro</i></b>	>114	3,008	

Adaptado de: (National Honey Board, 2016)

- **Conductividad eléctrica:** Es la capacidad de un material para atraer el flujo de una corriente eléctrica, es decir un flujo de electrones. De acuerdo, al Codex Alimentario, la conductividad eléctrica no debe ser mayor a  $0,8 \text{ ms cm}^{-1}$  en el néctar de una miel (Boukraâ, 2013, p. 26).
- **Higroscopicidad:** Es una característica de la miel, que le da la capacidad para absorber y retener la humedad del medio ambiente, se debe esta propiedad por su alta concentración de fructosa. El contenido normal de agua en la miel es del 18.8 % (Boukraâ, 2013, pp. 26–27).

## 2.6 Propiedades biológicas y usos

El manejo de las infecciones se ha visto comprometido, por el surgimiento de múltiples cepas microbianas resistentes a los tratamientos convencionales. Actualmente resulta un problema de inmensa magnitud ya que resulta difícil encontrar un tratamiento que sea efectivo, y que no genere grandes pérdidas económicas (Jenkins y Cooper, 2012, p. 1). Una opción ideal a esta situación pudiera ser el uso de productos naturales como la miel, que pueden ser utilizados en conjunto con antibióticos para disminuir los mecanismos de biorresistencia de los microorganismos patógenos y así mismo contribuir a su

control (Jenkins y Cooper, 2012, p. 1). Actualmente la bibliografía científica reporta numerosos casos mediante el cual la miel de abeja ha sido efectiva como es el caso en tratamientos de quemaduras, heridas, úlceras en la piel, e inflamación. Demostrando que más allá de sus propiedades antimicrobianas, la miel ayuda a acelerar el proceso de crecimiento de nuevo tejido en heridas y por ende de su cicatrización (Mandal y Mandal, 2011, p. 155).

## **2.7 Acción antimicrobiana de la miel de abeja**

La actividad microbiana de la miel consiste en dos mecanismos fundamentales:

**Actividad no peróxido y peróxida:** La actividad no peróxida, está relacionada fundamentalmente por la acción del pH, la alta osmolaridad, compuestos orgánicos como metilglioxal, el péptido abeja-defensina-1 y metabolitos flavonoides. Por otro lado, la actividad peróxida, se lleva a cabo por acción del peróxido de hidrógeno producido por la acción sobre la glucosa de la enzima glucosa oxidasa ( Alvarez-Suarez, Giampieri y Battino, 2013, pp. 13–14).

### **2.7.1 Peróxido de hidrógeno**

La glándula hipofaríngea de la abeja, es el órgano encargado de secretar una enzima llamada glucosa oxidasa que actúa sobre la glucosa presente en el néctar de la flor con la subsecuente liberación de  $H_2O_2$  (Mizrahi y Lensky, 2013, p. 28), siendo un compuesto altamente efectivo por sus propiedades antimicrobianas. Es importante destacar que el peróxido de hidrógeno es efectivo solamente si existe una concentración alta de este componente (Bang, Bunting y Molan, 2003).

Existen además varios reportes que demuestran que este compuesto, además de sus propiedades antimicrobianas, está asociado con la estimulación para la proliferación celular en tejidos (Bang et al, 2003). A pesar de los beneficios que ejerce el peróxido de hidrógeno, este puede ser inactivado mediante la exposición a la luz o calor (Kwakman y Zaat, 2012, p. 49).

### **2.7.2 Actividad antimicrobiana no peróxida**

Esta actividad antimicrobiana, se lleva a cabo, gracias a la ayuda de componentes como los ácidos fenólicos y el péptido defensina-1 (Kwakman et al., 2011). Se ha demostrado además que los ácidos fenólicos, por si solos, pueden causar la disminución del crecimiento de bacterias (Boukraâ, 2013, p. 41).

Otro factor de actividad antimicrobiana no peróxida es el pH. La miel es ligeramente ácida, pH de 3.2 a 4.5 y por ende, actúa inhibiendo el crecimiento de microorganismos patógenos que son neutrófilos (Boukraa, 2013, p. 40).

Otro factor que influye en la actividad antimicrobiana, es el péptido -defensina-1. Es de naturaleza catiónica e interactúa con las superficies negativas de los microorganismos, por lo que se requiere de un dominio hidrofóbico para la penetración de la membrana, ocasionando sin duda la disrupción de la misma o la translocación de la célula del microorganismo (Kwakman et al., 2011, p. 253).

El efecto osmótico de la miel también contribuye ya que la miel de abeja posee un alto contenido de solutos, pero con bajo contenido de agua, lo que provoca presión sobre el gradiente osmótico. Esta presión genera que todo el exudado de las heridas salga hacia la superficie, ayudando de esta manera a que se elimine todo el tejido muerto y además produzca una deshidratación de la célula bacteriana (Gibson, D., Yang, Q., Kerekes, D., Schultz, 2014, p. 309).

### **2.7.3 Propiedades antimicóticas**

No se sabe con claridad cuál es el efecto de la miel y su acción en hongos patógenos, sin embargo, se cree que la osmolaridad sea el principal factor (Boukraâ, 2013, p. 43).

## **2.8 Efecto antiinflamatorio**

La miel es promotora de estimulación de la respuesta inflamatoria en los leucocitos. Es decir, determina la activación de varios elementos intra y extracelulares relacionados con la respuesta inflamatoria. Según varios estudios, se ha comprobado que concentraciones de miel menor al 0,1 % son capaces de activar a los linfocitos, que a su vez promoverá la formación de células promotoras de tejido por medio de la estimulación de los procesos de granulación, angiogénesis y la epitelización (Boukraâ, 2013, p. 45).

## **2.9 Importancia económica**

La miel, ha sido considerada vital para la medicina, ya que desde los inicios de la civilización humana ha sido utilizada para la nutrición y la medicina. Se cree que los primeros indicios de su uso empiezan en los años 2100 al 2000 AC (Mandal y Mandal, 2011, p. 155).

La apicultura es un tipo de actividad económica caracterizada por la producción y comercialización de los productos obtenidos de la crianza de las abejas, constituyendo actualmente un negocio de importancia a nivel mundial. A pesar de sus inigualables beneficios, el uso de miel de abejas no ha sido valorado por los productores y mucho menos por los consumidores en su totalidad (Jaffé et al, 2015, p. 1). Se debe agregar que el costo de producción de la miel es mínimo en comparación con su alto retorno de inversión (Ajibola, Chamunorwa y Erlwanger, 2012, p. 9). Para tener una idea general de la producción, los últimos reportes de la producción mundial de abeja informan que en el mundo anualmente se produce un aproximado de 1.2 millones de toneladas, donde los mayores productores son China, Argentina y México, acumulando el 60% de la producción a nivel mundial (FAO, s.f., p. 143).

## **2.10 Producción de miel de abeja en Ecuador**

Ecuador cuenta con una gran biodiversidad, brindando una capacidad notable para producir mieles únicas, sin embargo, la producción nacional es limitada, contribuyendo solo al 0,1 % de la economía del Ecuador (Dinero, 2006). Actualmente las entidades como MAGAP y Agrocalidad en el país trabajan en conjunto con los apicultores para incrementar el potencial productivo de la miel de abeja (MAGAP, s.f.).

De acuerdo, a Hugo Rosero, responsable del Programa Nacional Sanitario Apícola de la Agencia Ecuatoriana de Agrocalidad, en la última actualización del Catastro Apícola del Ecuador, 2016, el país cuenta con un total de 21595 colmenas en estado productivo (MAGAP, s.f.). El programa Nacional, pretende llegar a aumentar el número de colmenas, alrededor de 60 mil, así como el número de apicultores para lograr producir 600 toneladas de miel por año y abastecer tanto la demanda nacional como internacional (Agronegocioecuador, 2015).

### **2.10.1 Producción de miel de abeja en las provincias de Pichincha y Bolívar.**

La provincia de Bolívar, cuenta con un número de 28 apicultores, de entre los cuales poseen 31 colmenas y para un total de 184 colmenas (Pineda, 2010, p. 3).

Por otra parte, la provincia del Pichincha, posee la mayor cantidad de apicultores a nivel nacional, con 138, contando con un total de 10552 colmenas (Pineda, 2010, p. 3).

## 2.11 Microorganismos patógenos

### 2.11.1 Género clostridium

Este género se clasifica en dos grupos: el primero que corresponde a la *Clostridia histotóxica* que por su poder invasivo y destructivo ocasiona la pérdida del músculo y tejido conectivo, dando como resultado la formación de gas. Los principales representantes de este grupo son: *C. colinum*, *C. hemolyticum*, *Clostridium chavoei*, *C. novyi*, *C. perfringens*, *C. sordellii* y *C. septicum*. Con respecto al otro grupo están las Clostridias neurotóxicas, que se distinguen por producir neurotoxinas, pero que sin embargo, no son invasivas, como: *C. spiroforme*, *C. tetani*, *C. difficile* y *C. botulinum* (Langroudi, 2015).

#### 2.11.1.2 Clostridium perfringens

*Clostridium perfringens* es una bacteria gram-positiva, anaerobio aero tolerante que mide de (0,6 a 0,8 x 2-4  $\mu$ m). Esta produce esporas ovaladas, a la vez es inmóvil, y produce toxinas (Markey, Leonard, Archambault, Cullinane, 2013, p. 229). La temperatura ideal para el crecimiento de dichas bacterias es de 35 a 40 grados centígrados (Acha y Szyfres, 2001).

Las bacterias anaerobias, como es el caso de *Clostridium perfringens*, no requieren de oxígeno para lograr crecer lo cual está estrechamente relacionado con su patogenicidad en las diversas enfermedades que causa (Nagoba, 2009, p. 44).

Esta bacteria vive normalmente dentro del tracto intestinal de animales, en el suelo y en las heces fecales. *Clostridium perfringens* posee varios tipos como son: A, B, C y D; el tipo "A" va a ser la bacteria que se localiza regularmente en el tracto intestinal, y que a su vez se diseminará en los suelos (Quinn et al, 2015, p. 243). La distribución geográfica de *Clostridium perfringens* es a nivel mundial (Acha y Szyfres, 2001).

Tabla 2. Modo de transmisión de *Clostridium Perfringens*

MODOS DE TRANSMISIÓN	
<i>Clostridium perfringens</i> tipo A	Suelo contaminado en áreas cercanas A través de la leche materna y el medio ambiente
<i>Clostridium perfringens</i> tipo C	
<i>Clostridium perfringens</i> tipo D	
<i>Clostridium perfringens</i> tipo B	

Adaptado de: (Acha y Szyfres, 2001).

Los principales factores de riesgo, para que se produzca micronecrosis clostridianas son: la sobrealimentación, heridas, cambios repentinos en la dieta del animal (cambio de dieta de leche o pasto a granos), la deficiencia de cobre puede favorecer a este tipo de patología, así como las condiciones de anaerobiosis requeridas para el crecimiento de este patógeno (Haskell, 2008, p. 216).

Las esporas de este microorganismo, son ingeridas por los animales en el suelo o pasto. Estas proliferan cuando encuentran las condiciones favorables para su crecimiento. Se ha demostrado que dietas altas en carbohidratos, favorecen este tipo de agente patógeno con la subsecuente generación de toxinas (Haskell, 2008).

Los clostridios entran al organismo mediante una herida profunda, estos establecen las condiciones necesarias para que germinen las esporas de la especie *perfringens* y proliferen. Las heridas, se contaminarán de bacterias aerobias, provocando la disminución del oxígeno y a la vez aumentando las condiciones de anaerobiosis. El proceso de anaerobiosis, con lleva a la disminución del pH y al aumento de ácido láctico, este a su vez produce la liberación de enzimas proteolíticas y tóxicas que van a ser nocivas para los tejidos (Granados y Villaverde, 1997).

**Toxina Alfa:** Esta toxina se adhiere a la fosforilcolina de superficie exterior de la bicapa de fosfolípidos de la célula del huésped (Li et al., 2013, pp. 209–210).

Es decir que la toxina alfa (fosfolipasa) ataca directamente a las células de la membrana, ocasionando muerte celular y necrosis del tejido (Markey et al, 2013, pp. 229–230).

**Toxina Beta:** Esta es producida por el *Clostridium* tipo B y A, a pesar de que no se han realizados estudios sobre la interacción de la estructura de la toxina beta y su función (Li et al., 2013, pp. 209–210). Es necesario conocer sus efectos sobre los huéspedes como son: enteritis necrotizante, provocando la degeneración de las células endoteliales, trombosis y necrosis (Markey et al, 2013, pp. 229–230). Una vez que las toxinas beta son producidas en el intestino, estas llegan a ser absorbidas hacia la circulación causando enterotoxemia, que puede llegar a ser letal (Li et al., 2013, pp. 209–210).

**Toxina Épsilon:** Es considerada la más potente después de las toxinas botulínicas. La proteasa tripsina es la encargada de activarla en los intestinos. Induce a la liberación de K, desencadenando la muerte celular mediante la disminución de ATP (Li et al, 2013, p.209-210). La forma en la que actúa esta toxina es mediante la interrupción de las vías de producción de energía de las células. El daño que ocasiona en el endotelio vascular conlleva a la pérdida de fluido y edema (Markey et al, 2013, pp. 229–230).

La toxina épsilon aumenta la permeabilidad intestinal, lo que hace que sea más fácil la entrada hacia el torrente sanguíneo. Una vez adentro, afectarán a varios órganos como: riñones, pulmones y cerebro (Li et al., 2013, pp. 209–210).

**Toxina Iota:** Es perteneciente a la familia de toxinas binarias (Li et al, 2013, p. 209-210). Tiene actividad enzimática, lo que ocasiona que la actina ADP-ribosilato separe al citoesqueleto de la célula huésped, dando como resultado la apoptosis celular (Markey et al, 2013, pp. 229–230).

### 2.11.1.2.1 Infecciones clínicas en animales

*C. perfringens* tipo A se asocia a muchas enfermedades, como son enterocolitis necrotizante en cerdos, enteritis necrotizante en aves, tifocolitis en caballos y gastroenteritis hemorrágica en perros. Por otro lado, tipo B, C, y D ocasionan mayormente enterotoxiosis en ovinos con la presencia de abundantes diarreas. Por último, el tipo E, causa enteritis hemorrágica en bovinos y enteritis en conejos (Quinn et al, 2015, p. 243).

Tabla 3. Enfermedades causadas por *Clostridium perfringens* en animales.

Tipo de <i>Clostridium perfringens</i>	Huésped	Enfermedad	Tipo de toxina
<b>A</b>	<b>Cerdos</b>	Enterocolitis necrotizante	$\alpha$
	<b>Caballos</b>	Enteritis neonatal	$\alpha$
	<b>Aves</b>	Enteritis necrotizante	Net B
	<b>Perros</b>	Gastroenteritis hemorrágica	$\alpha$
<b>B</b>	<b>Terneros y Potros</b>	Disentería	$\beta$
	<b>Corderos</b>	Enteritis hemorrágica	$\alpha$
<b>C</b>	<b>Potros, lechones, terneros corderos</b>	Entero toxemia hemorrágica	$\alpha$ $\beta$
		Golpe	TpeL
	<b>Ovejas y cabras</b>		$\beta_2$ $\theta$
<b>D</b>	<b>Ovejas</b>	Entero toxemia	$\alpha$
	<b>Terneros</b>	Entero toxemia	$\alpha$

Adaptado de: (Markey et al, 2013, p. 231).

## 2.12. Género *Candida*

Existen varias especies de *Candida* que se hallan en una relación saprofita con los animales. Estas levaduras pueden vivir normalmente dentro del tracto gastrointestinal, tejidos subcutáneos y en la piel. No obstante, son patógenos oportunistas que al primer signo de debilidad sistémica e inmune dentro de huésped van a causar enfermedades (Kurtzman, Fell y Boekhout, 2011, p. 9).

Las especies de *Candida* crecen en ambiente aerobio a una temperatura de 37 grados en medios como Agar Papa Dextrosa (Quinn et al, 2015). La morfología de las especies son de forma ovoide, pequeñas, con una pared delgada mediante el cual se reproducen principalmente por gemación (Kurtzman, Fell, y Boekhout, 2011, p. 10). La coloración puede variar de crema a amarillo, así como su textura puede ser brillante, arruga, suave, seca o sin brillo. El tamaño de las células oscila entre 2–5 × 3–7  $\mu\text{m}$  (Larone, 2002).

Las diferentes especies de *Candida* se encuentran distribuidas a lo largo del mundo, usualmente como levaduras comensales, en el sistema digestivo y urogenital de los animales (Quinn et al, 2015).

Tabla 4. Características morfológicas de *Candida* spp.

Especies	Producción de tubos germinativos	Hifas/pseudohifas	Tamaño( $\mu\text{m}$ )	Color de colonia en agar
<i>C. albicans</i>	+	+/+	4-6x6-10	Azul-verde
<i>C. tropicalis</i>	-	<u>+/+</u>	4-6x5-11	Azul oscuro

Adaptado de: (Silva et al., 2012)

### 2.12.1. *Candida tropicalis*

*Candida tropicalis* es una levadura que mide de 4–8  $\mu\text{m}$ , además de formar colonias de color crema con bordes miceliarios. Produce blastoesporas ovaladas, igualmente pseudohifas, e inclusive hifas de acuerdo a algunos

estudios (Calderone y Clacy, 2011). Una característica es su capacidad para fermentar y asimilar maltosa y sacarosa (Martin en Silva, 2012).

### 2.12.1.1 Enfermedades y huéspedes causados por *Candida tropicalis*

Uno de los microorganismos involucrados en la mastitis y abortos micóticos de los bovinos es *Candida tropicalis*, normalmente ocurre este tipo de patología por la contaminación de los equipos y herramientas de ordeño, así mismo por el mal aseo sanitario del equipo y de las manos del ordeñador (Santana, Luiz, Ferreira, 2011, p. 207).

Tabla 5. Enfermedades causadas por *Candida tropicalis* en animales.

Organismo	Especies afectadas	Lesiones	Especímenes
Cándida tropicalis	Perros/Gatos	Estomatitis micótica, Enteritis en gatitos	Raspado de tejido afectado

Adaptado de: (Sirois, 2012, p. 345)

### 2.13. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa*, es una bacteria gram-negativa que mide de 0.5 a 1 x 1 a 5  $\mu\text{m}$ , además es aerobia y oxida a los carbohidratos. La mayoría de las especies de *Pseudomonas* son catalasa-positiva y oxidasa-positiva. Son bacterias móviles, por su flagelo. Normalmente la *Pseudomonas aeruginosa*, se cultiva en el agar MacConkey (Quinn et al, 2011).

#### 2.13.1. Mecanismo de acción

*Pseudomonas* es una bacteria oportunista mediante el cual toma ventaja una vez que las defensas de su huésped caen, también por la constante presencia de humedad, y además por catéteres intravenosos o urinarios contaminados con dicho patógeno (Quinn et al, 2015, p. 62).

Este microorganismo libera enzimas y toxinas, causando un daño irreversible al tejido, así como la invasión de este. La replicación y colonización de la bacteria se da por las exoenzimas, el flujo extracelular y los lipopolisacáridos de la membrana exterior. Las responsables del daño de tejido son las toxinas que liberan, como son: La exotoxina A, fosfolipasas y proteasas y las citotoxinas (Quinn et al, 2015, p. 62).

### 2.13.2. Infecciones clínicas

Causa una variedad de infecciones, que van a depender del tipo de especies y de ambiente para que éstas proliferen. Esta bacteria causa el 50% de casos de mortalidad en neumonía hemorrágica y septicemia (Quinn et al, 2011, p. 288).

Tabla 6. Enfermedades causadas por *Pseudomona aeruginosa* en animales.

Huésped	Enfermedad
Ovinos	Mastitis, descomposición del vellón, neumonía, otitis media.
Bovinos	Metritis, mastitis, neumonía, dermatitis, enteritis.
Porcinos	Infecciones respiratorias, otitis
Equinos	Infecciones del tracto genital, queratitis ulcerativa, neumonía.
Caninos	Cistitis, neumonía, queratitis ulcerativa, otitis externa.
Visón	Septicemia, neumonía hemorrágica.
Chinchillas	Septicemia, neumonía.
Reptiles	Estomatitis necrótica.

Adaptado de: (Quinn et al, 2015, p. 62)

### 2.14. ASPERGILLUS

Las especies de *Aspergillus* son colonias que crecen rápido, son hongos filamentosos, aerobios con una hifa tabicada. Algunos tienen colonias de colores llamativos que pueden variar desde azul-verduzco hasta amarillo-negruczo debido a la intensa producción de esporas pigmentadas (conidias). Las conidias son pequeñas y ovaladas de 2-3  $\mu\text{m}$ , con fialide<sup>1</sup> en posición radial sobre la superficie de la hifa aérea (conidiofore) (Markey et al, 2013, p. 481).

Se encuentran en el suelo y en su gran mayoría en materia orgánica en descomposición. Las esporas de estos patógenos se localizan en el aire y en el polvo (Quinn et al, 2011).

Los *Aspergillus* pertenecen al grupo de los *Ascomicetos*, estos tienen una reproducción asexual, pero también es común la reproducción homotálica, es decir auto fertilización (Bennet, 2010).

#### **2.14.1 Mecanismos de acción**

Una vez que *Aspergillus* deposita sus esporas en su huésped, las células fagocíticas promueven la respuesta de inflamación, que, en conjunto con la liberación de proteasas, fosfolipasas y elastasas fúngicas dan como resultado el daño de tejido (McVey, Kennedy y Chengappa, 2013).

En el caso de las infecciones pulmonares, las esporas que fueron inhaladas, inducen en la formación de exudados que se acumulan en los bronquiolos. Si la infección es muy fuerte, estos pueden extenderse hasta llegar a los vasos sanguíneos, provocando inflamación vascular, y una posible formación de trombos que se pueden diseminar a otras áreas del cuerpo (Markey et al, 2013, p. 481).

Tabla 7. Enfermedades causadas por *Aspergillus* en animales.

Huéspedes	Condición	Comentarios
<b>Aves</b>	Neumonía	La infección se da por la alta exposición a esporas que se encuentran en las incubadoras.
	Aspergilosis	Aves con neumonía debido a camas y alimento contaminados.
<b>Perros</b>	Aspergilosis nasal	Presencia alta en razas dolicocefalias. Alta descarga nasal.
	Otitis externa	Ocurre cuando hay una infección de por medio.
<b>Bovinos</b>	Aspergilosis sistémica	Se da generalmente en pastores alemanes.
	Aborto micótico	Casos esporádicos, en donde la pared de la placenta se vuelve gruesa.
	Mastitis micótica	Enfermedad crónica, causada por tubo intramamarios contaminados.
<b>Caballos</b>	Aspergilosis intestinal	En terneros.
	Neumonía micótica	Aparece rara vez.
	Micosis de la bolsa gular	Infección necrótica de la bolsa gular.
	Granuloma nasal	Descarga nasal.
	Aspergilosis intestinal	Se da en potros.
	Queratomicosis	Seguido de un trauma ocular.

Adaptado de: (Quinn et al, 2011)

### 3. CAPITULO III: METODOLOGÍA

#### 3.1 Ubicación geográfica

El estudio se realizó en la Provincia de Pichincha, cantón Quito. La ciudad de Quito, se localiza en la zona centro-norte del Ecuador, a 2.850 metros sobre el nivel del mar, sus coordenadas son: latitud: -0.216667 y longitud: -78.5. La investigación se da dentro de los laboratorios de la Universidad de las Américas (UDLA), y Laboratorios Ciencias de la Vida en la Universidad Politécnica Salesiana (Centro de Investigación y valoración de la biodiversidad), en la ciudad de Quito.

Las mieles utilizadas se produjeron en diferentes zonas del país, como es el caso de la miel de Ñachag, esta es producida en la zona norte de Quito, parroquias de Calacalí y San Antonio de Pichincha.

La miel de Nabo Silvestre, se produjo en la provincia de Bolívar, cantón Chillanes. La provincia se encuentra al centro-oeste del país, cuenta con una extensión de 3.254 km<sup>2</sup>, sus coordenadas son: Latitud: -1.933333 y Longitud: -79.0667.

La miel de flores tropicales, se produce en zonas tropicales del Ecuador, más específicamente vía el empalme, localizada dentro de la provincia del Guayas. La provincia limita al norte con las provincias de Manabí y los ríos, al sur con la provincia del Oro, al este con Cañar, Azuay, Chimborazo y Bolívar, finalmente al oeste se limita por las provincias de Santa Elena y Manabí.



Figura 1. Mapa de la procedencia de la miel de Nabo silvestre (Prov. Bolívar-Cantón Chillanes)  
Adaptado de: (Google, s.f.)



Figura 2. Mapa de la procedencia de la miel de Nachag (Prov. Pichincha-Calacalí-San Antonio de Pichincha)  
Adaptado de: (Google, s.f.)



Figura 3. Mapa de la procedencia de la miel de flores tropicales (Prov. del Guayas-Vía del Empalme)

Adaptado de: (Google, s.f.)

### 3.2 Diseño de estudio

Se utilizó un total de 15 muestras de miel de abeja (*Apis mellífera ssp*), 5 de cada floración (ñachag, nabo y flores tropicales). Para el estudio de la actividad antimicrobiana de las mieles se utilizó cepas de *Clostridium perfringens*, *Pseudomona aeruginosa*, *Aspergillus brasiliensis*, *Candida tropicalis*, que se obtuvieron de las cepas ATCC (Colección de cultivo tipo americano) del banco del Laboratorio de la Universidad Politécnica Salesiana, campus el Girón.

Cada una de las mieles, se sembró para cada una de las cepas antes mencionadas. Una vez sembradas las cepas de estos microorganismos, al día siguiente se realizó 4 pocillos, y se procedió a poner la miel a 25%, 50%, 75% y al 100%. Finalmente, se realizó la medición de los halos de inhibición cada 8 horas. Se realizaron tres réplicas por experimento con 6 mediciones cada una.

### 3.3 Materiales

#### 3.3.1 Materiales de laboratorio

- 1 botella de laboratorio de 1000 ml marca Boeco ®.
- 2 botellas de laboratorio de 500 ml marca Boeco ®.
- 15 vasos de precipitado de 50 ml marca Boeco ®.
- 1 vaso de precipitado de 1000 ml marca Glassco ®.
- 2 vasos de precipitado de 500 ml marca Glassco ®.
- 2 asas Digralski Marienfield ®.
- 2 asas de metal Marienfield ®.
- 4 tubos de cultivo de 16 x 125 mm con tapa rosca marca KIMAX ®.
- 5 cajas de fósforos marca del sol ®.
- 2 mecheros de alcohol Schott Duran®
- 3 cajas de guantes de examen de látex Nipro ®.
- 3 cajas de mascarillas quirúrgicas marca Aérokyn ®.
- 2 rollos de papel de cocina marca Scott ®.
- 30 cajas Petri de vidrio de 150 x 15 mm Marienfield ®.
- 1 rollo de papel parafilm Laboratory Film ® de 10.2 cm x 38.1 mt.
- 2 cajas de papel aluminio Supermaxi ®.
- 1 caja de fundas de cierre hermético Supermaxi ®.
- 2 espátulas de acero inoxidable con mango de madera marca Bel-art ®.
- 1 micropipeta Ecopipette Capp de 100-1000 ml
- 2 fundas de 500 puntas estériles para micropipetas marca Eppendorf ® de 100-1000 ml.
- 1 piceta integral de 500 ml, para agua destilada marca Bel-art ®.
- Recuperador de barras magnéticas de mano marca Bel-art ®.
- 1 galón de agua destilada Casa del Químico.
- 1 galón de alcohol potable al 95% Casa del Químico.
- 3 mieles de Ñachag.
- 3 mieles de Nabo.
- 2 mieles de flores tropicales.

- Difco <sup>TM</sup> Agar Triptasa de Soya (TSA) de la casa Becton Dickinson.
- Agar Dextrosa Sabouraud Difco.
- Agar Dextrosa papa Oxoid.

#### Equipos:

- Autoclave Tuttnauer 3870
- Incubadora Incucell
- Cámara de flujo laminar 1300 series A2
- Balanza Schimadzu
- Densitómetro Mettler-Toledo
- Baño maría, tina de acero inox. con tapa marca Labnet

### 3.4 Métodos

#### 3.4.1 Cálculos para la preparación de medios

$\begin{array}{r} 38 \text{ g} \quad \text{-----} \quad 1000 \text{ ml} \\ X \quad \quad \quad \text{-----} \quad 500 \text{ ml} \\ \hline 19 \text{ g de Agar Dextrosa Papa} \end{array}$	$\begin{array}{r} 40 \text{ g} \text{-----} 1000 \text{ ml} \\ X \quad \text{-----} 1000 \text{ ml} \\ \hline 40 \text{ g de Agar Triptasa de Soya (TSA)} \end{array}$
--	--

$$\begin{array}{r} 65 \text{ g} \text{-----} 1000 \text{ ml} \\ X \text{-----} 500 \text{ ml} \\ \hline 32.5 \text{ g de Agar Dextrosa Sabouraud} \end{array}$$

#### 3.4.2 Preparación de los medios de cultivo

Cada uno de los medios utilizados (Agar Papa Dextrosa, Agar Sabourand, y Agar Triptasa Soya) tienen las instrucciones de acuerdo a la casa comercial. Se pesaron en la balanza 19 g de Agar Dextrosa Papa, y se diluyó en 500 ml de agua destilada en una botella de laboratorio. Por otra parte, se pesó 32.5 g de Agar Dextrosa Sabouraud, e igualmente se diluyó en 500 ml de agua destilada en una botella de laboratorio, y finalmente se pesó 40 g de Agar

Triptasa de Soya (TSA) y se diluyó en 1000 ml de agua destilada en una botella de laboratorio.

Una vez preparados los medios, en cada botella de laboratorio se colocó un imán, y se procedió a calentar y agitar los medios en un agitador magnético a 250 C° y 200 RPM.

Se retiró el imán y se colocaron los medios con la tapa semi cerrada dentro del autoclave por 30 minutos y luego se esperó 15 minutos para que el descenso la presión y temperatura del autoclave.

Una vez templados los medios, se procedió a llevarlos a la cámara de flujo laminar, dentro de ella se coloca las cajas a dispensar, previamente esterilizadas. Se colocó aproximadamente 20 ml del medio, se esperó hasta que el medio tenga una consistencia sólida. Se envolvió las cajas Petri en papel aluminio y se procedió a refrigerarlas a 4 C°.

### **3.4.3 Preparación de los inóculos**

Se prepararon suspensiones de cada uno de los microorganismos, extrayendo un inóculo de cada cultivo respectivo de la cepa control con un asa de siembra estéril en un mechero, es decir se tomó 4 asadas de las cepas ATCC y se depositó en un tubo de ensayo con 10 mL de agua destilada, finalmente se agitó para obtener una mezcla homogénea.

Posteriormente, de las suspensiones previamente realizadas, se extrajo 500 ml y se depositó dentro de las cajas Petri con los medios de cultivos correspondientes para cada cepa. A continuación, se colocó las cajas Petri dentro de la incubadora a 24 C°, en el caso de *Clostridium Perfringens* se incubó en condiciones de anaerobiosis en incubador con CO<sub>2</sub> al 5 %. En el caso de bacterias, se dejó en la incubadora por 24 horas. En hongos y levaduras, dejó en la incubadora de 5 a 7 días.

### 3.4.4 Metodología para la dilución de las mieles

Se prepararon disoluciones de cada miel con agua peptonada estéril. Las soluciones de trabajo fueron: 75%, 50%, 25% (p/v), así como miel pura (100%).

#### 3.4.4.1 Cálculos para todas las diluciones

$$\rho = \frac{m}{v} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

$$\rho \cdot v = m \quad \text{(Ecuación 2)}$$

### 3.4.5 Medición de densidad

La densidad se midió utilizando un densitómetro. Se pesó 1 g de la muestra de miel, y se la diluyó en 40 ml de agua destilada. Posteriormente, se colocó el tubo del densitómetro en la muestra diluida, se anotó los resultados, se limpió el tubo con acetona y se secó.

Tabla 8. Medición de densidad de las diferentes mieles estudiadas

	Densidad 1	Densidad 2	Densidad 3	Densidad total
Nb1	1,0083	1,0083	1,0082	1,0083
Nb2	1,0083	1,0082	1,0084	1,0083
Nb3	1,0079	1,0079	1,0079	1,0079
Ng1	1,0086	1,0087	1,0088	1,0087
Ng2	1,0068	1,0069	1,0068	1,0068
Ng3	1,0085	1,0086	1,0087	1,0086
Tp1	1,0055	1,0058	1,0058	1,0057
Tp2	1,0077	1,0077	1,0080	1,0078

Dilución Miel Nb1

$$\left(1.0083 \frac{g}{m^3}\right) x (0,1 \text{ ml}) = 0,10 \text{ g} = 0,1 \text{ ml} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Dilución Miel Nb2

$$\left(1.0083 \frac{g}{m^3}\right) x (0,1 \text{ ml}) = 0,10 \text{ g} = 0,1 \text{ ml} \quad \text{(Ecuación 4)}$$

Dilución Miel Nb3

$$\left(1.0079 \frac{g}{m^3}\right) x (0,1 \text{ ml}) = 0,10 \text{ g} = 0,1 \text{ ml} \quad \text{(Ecuación 5)}$$

Dilución Miel Ng1

$$\left(1.0087 \frac{g}{m^3}\right) x (0,1 \text{ ml}) = 0,10 \text{ g} = 0,1 \text{ ml} \quad \text{(Ecuación 6)}$$

Dilución Miel Ng2

$$\left(1.0068 \frac{g}{m^3}\right) x (0,1 \text{ ml}) = 0,10 \text{ g} = 0,1 \text{ ml} \quad \text{(Ecuación 7)}$$

Dilución Miel Ng3

$$\left(1.0086 \frac{g}{m^3}\right) x (0,1 \text{ ml}) = 0,10 \text{ g} = 0,1 \text{ ml} \quad \text{(Ecuación 8)}$$

Dilución Miel Tp1

$$\left(1.0057 \frac{g}{m^3}\right) x (0,1 \text{ ml}) = 0,10 \text{ g} = 0,1 \text{ ml} \quad \text{(Ecuación 9)}$$

Dilución Miel Tp2

$$\left(1.0078 \frac{g}{m^3}\right) x (0,1 \text{ ml}) = 0,10 \text{ g} = 0,1 \text{ ml} \quad \text{(Ecuación 10)}$$

Dilución 1:  $(2,5 \text{ g} \div 10 \text{ ml})(25\%)$

**(Ecuación 11)**

0,10 g-----100%

X ----- 25%

X= 0,025 g

0,025 g -----0,1 ml

X -----10 ml

X= 2,5 g

Dilución 2:  $(5 \text{ g} \div 10 \text{ ml})(50\%)$

**(Ecuación 12)**

0,10 g-----100%

X ----- 50%

X= 0,05 g

0,05 g -----0,1 ml

X -----10 ml

X= 5 g

Dilución 3:  $(7,5 \text{ g} \div 10 \text{ ml})(75\%)$

(Ecuación 13)

0,10 g-----100%

0,075g -----0,1 ml

X ----- 75%

X -----10 ml

X= 0,075 g

X= 7,5 g

X= 2,5 g

### 3.4.6 Test antibiótico de Kirby-Baeur e interpretación

Para la determinación de la capacidad antimicrobiana de la miel de abeja se utilizó la técnica de KIRBY-BAUER que en su descripción original utiliza discos de antibióticos, sin embargo, en este estudio se realizó ponches siguiendo las modificaciones a esta técnica descritas en el manual Boundless Microbiology (Boundless Microbiology, 2016), que consiste en colocar el agente analizado dentro de cada pocillo, se procede a incubar el cultivo para facilitar la interacción entre el crecimiento de los microorganismos y la sustancia en análisis. Si las bacterias u hongos, son susceptibles a la sustancia en análisis, aparecerá una zona transparente o de tonalidad diferente, lo que indica que las bacterias no son capaces de crecer debido a la acción de la sustancia analizada, en este caso la miel de abeja (Boundless Microbiology, 2016).

### 3.4.7 Metodología para realizar los ponches

En placas petri, ya cultivadas, se realizaron cuatro pocillos con puntas estériles de diámetro conocido.

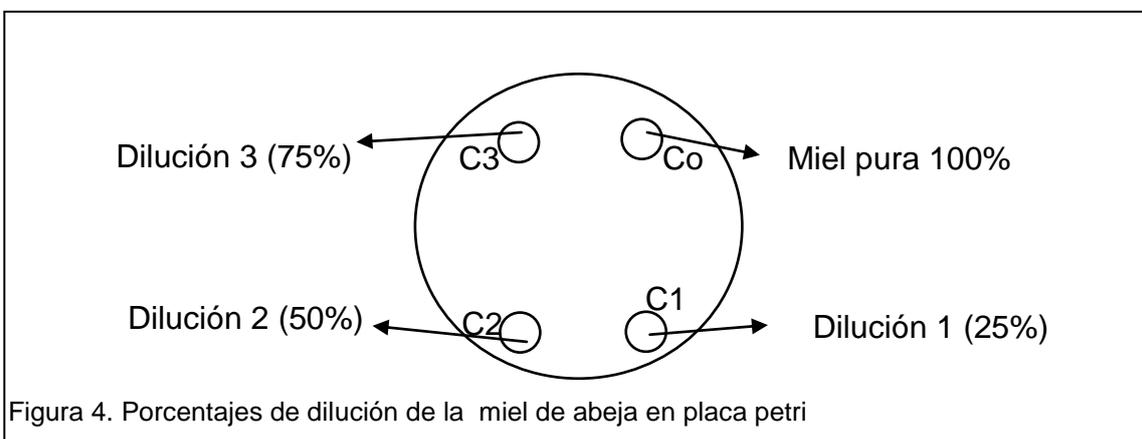


Figura 4. Porcentajes de dilución de la miel de abeja en placa petri

Se colocaron 600  $\mu$ L en cada pocillo de cada disolución de miel de abeja preparada y se incubó por 24 horas a 24°C. Después de la incubación, la actividad antibacteriana se determinó por la formación del halo de inhibición alrededor del inóculo y finalmente, se midió el halo de inhibición cada 8 horas, con seis mediciones.

#### **3.4.8 Metodología para la medición de halos**

Después de la incubación, se midió los tamaños de zona utilizando una regla. Al medir diámetros de la zona, siempre se redondeó por exceso y de igual manera se mantuvo la placa de algunas pulgadas sobre una superficie negra. Finalmente, se registró el tamaño de la zona en la hoja de registro (Hudzicki, 2010).

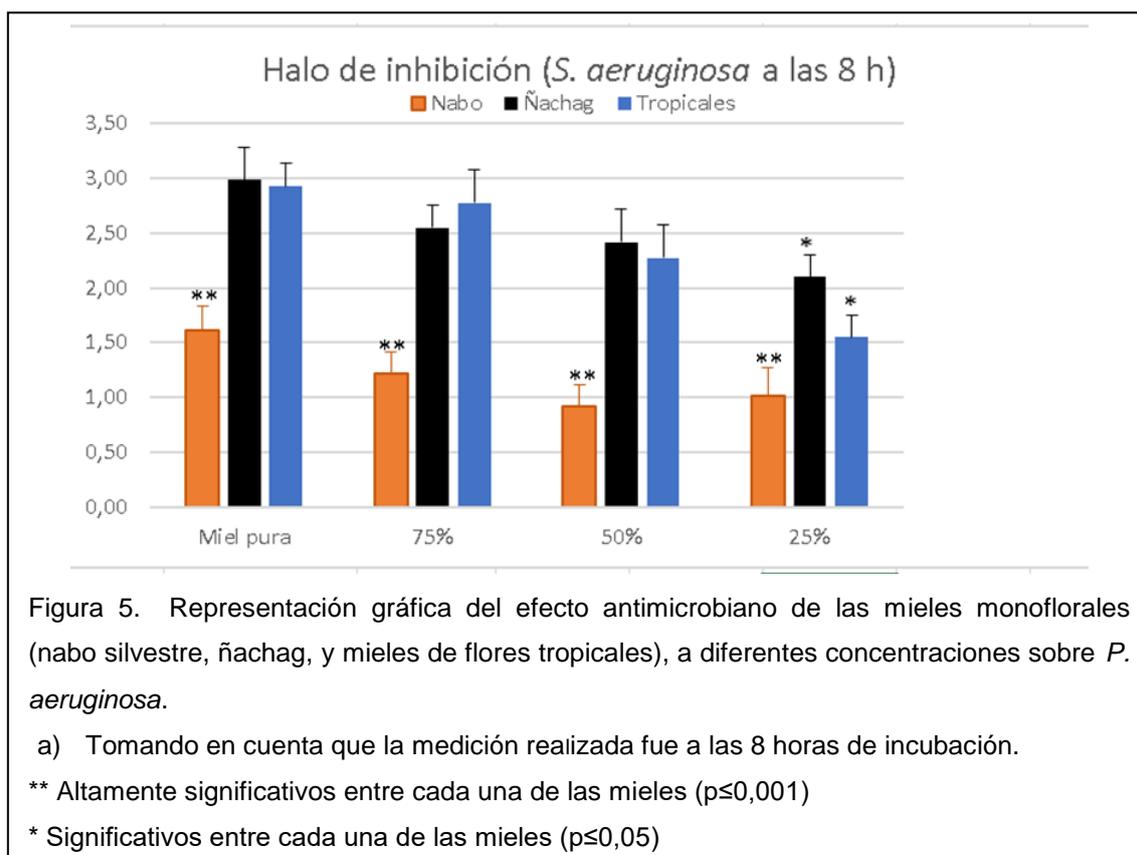
Si las zonas de los ponches de miel se superpusieran, el diámetro de la zona se midió mediante la medición del radio de la zona. Medida desde el centro del ponche a un punto en la circunferencia de la zona donde exista un borde evidente. Se debió multiplicar esta medida por 2 para la determinación del diámetro de la zona de inhibición (Hudzicki, 2010).

#### **3.5. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó el software STATISTICA (Statsoft Inc., tulsa, OK). Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza simple para la comparación de medias del promedio del diámetro de inhibición microbiana y las diferencias significativas de la acción de cada una las mieles se calcularon según la prueba de rango múltiple - HSD Tukey. En todos los ensayos los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (SD). El valor medio para la dilución mínima activa, en la prueba de actividad antimicrobiana y antifúngica, se calculó a partir de las cinco repeticiones, mientras que, para el resto de las pruebas, los resultados se expresaron como la media de tres análisis.

#### 4. CAPÍTULO IV: RESULTADOS

La actividad antimicrobiana de los tres tipos de miel de abeja *Apis mellifera* (Miel de Nabo silvestre, Ñachag, y flores tropicales) fueron analizadas para establecer su capacidad antimicrobiana y antifúngica ante *Clostridium perfringens*, *Pseudomona aeruginosa*, *Aspergillus brasiliensis* y *Candida tropicalis* a concentraciones de 100, 75, 50 y 25%.



En la figura 4, los tres tipos de mieles en estudio, presentaron inhibición de crecimiento en la cepa *S. aeruginosa* después de la medición a 8 horas de incubación. Sin embargo, la miel de nabo silvestre, en todas sus concentraciones, presentó una menor capacidad de inhibición del crecimiento microbiano siendo altamente significativa ( $p \leq 0,001$ ) en comparación con la miel de ñachag y flores tropicales. Por otra parte, la miel de ñachag, a la concentración de 25 %, presentó el mayor efecto antimicrobiano sobre *S. aeruginosa*.

La miel de ñachag y nabo, a concentraciones de Miel pura ,75 y 50%, no presentaron diferencias significativas en su acción inhibitoria del crecimiento bacteriano. Vale la pena destacar, que tanto la miel de ñachag como la de flores tropicales, a una concentración de 100% y 75%, presentaron el mayor efecto antimicrobiano sobre *P. aeruginosa*.

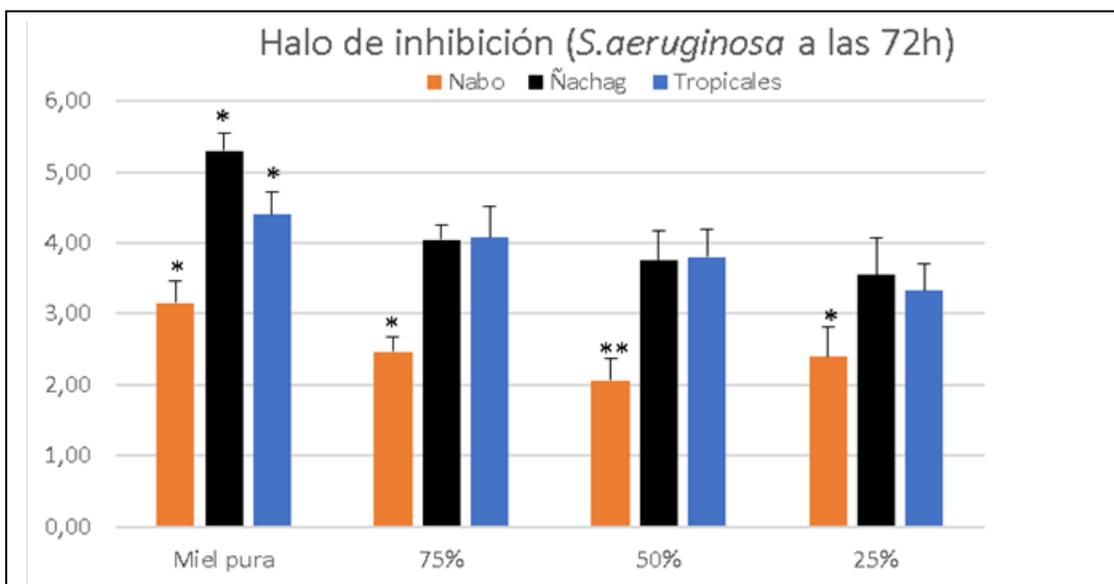


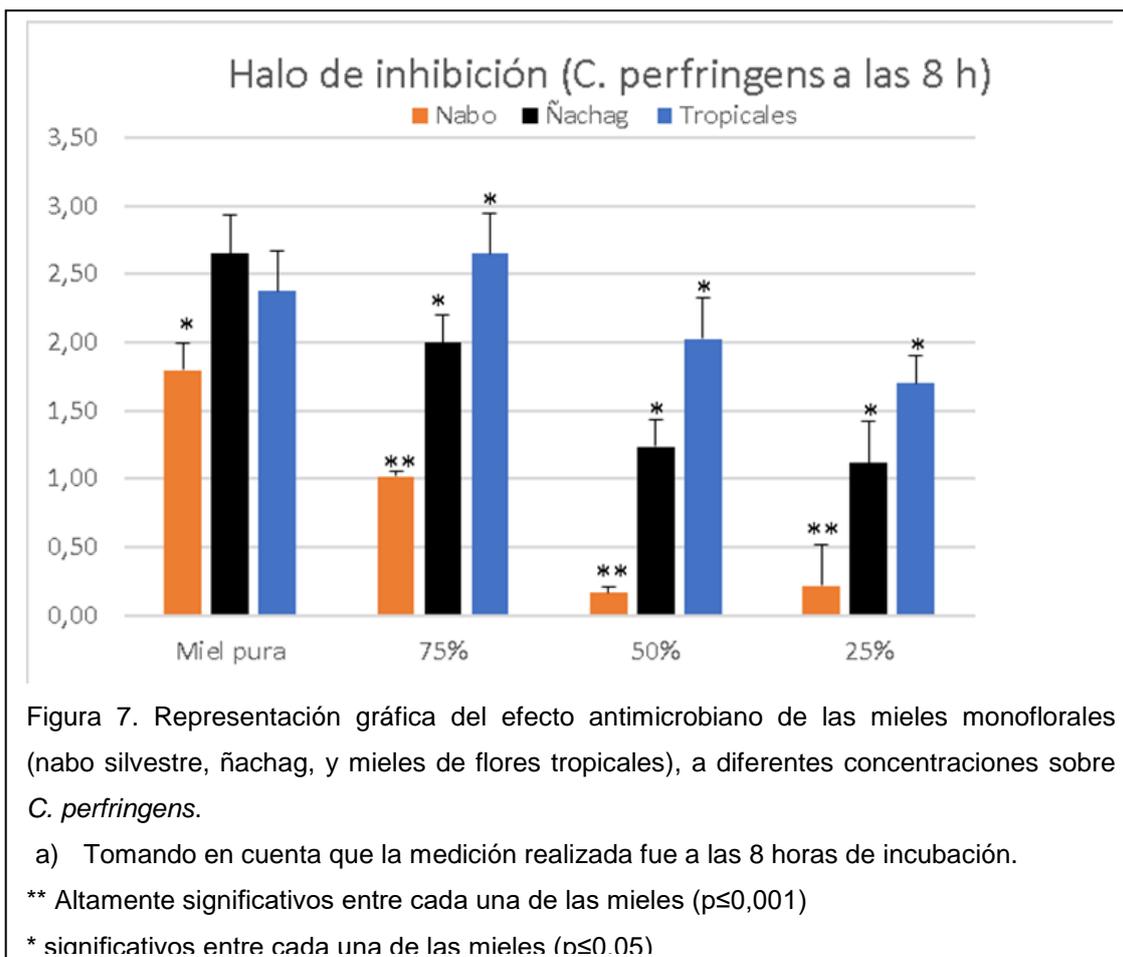
Figura 6. Representación gráfica del efecto antimicrobiano de las mieles monoflorales (nabo silvestre, ñachag, y mieles de flores tropicales), a diferentes concentraciones sobre *P. aeruginosa*.

a) Tomando en cuenta que la medición realizada fue a las 72 horas de incubación.

\*\* Altamente significativos entre cada una de las mieles ( $p \leq 0,001$ )

\* significativos entre cada una de las mieles ( $p \leq 0,05$ )

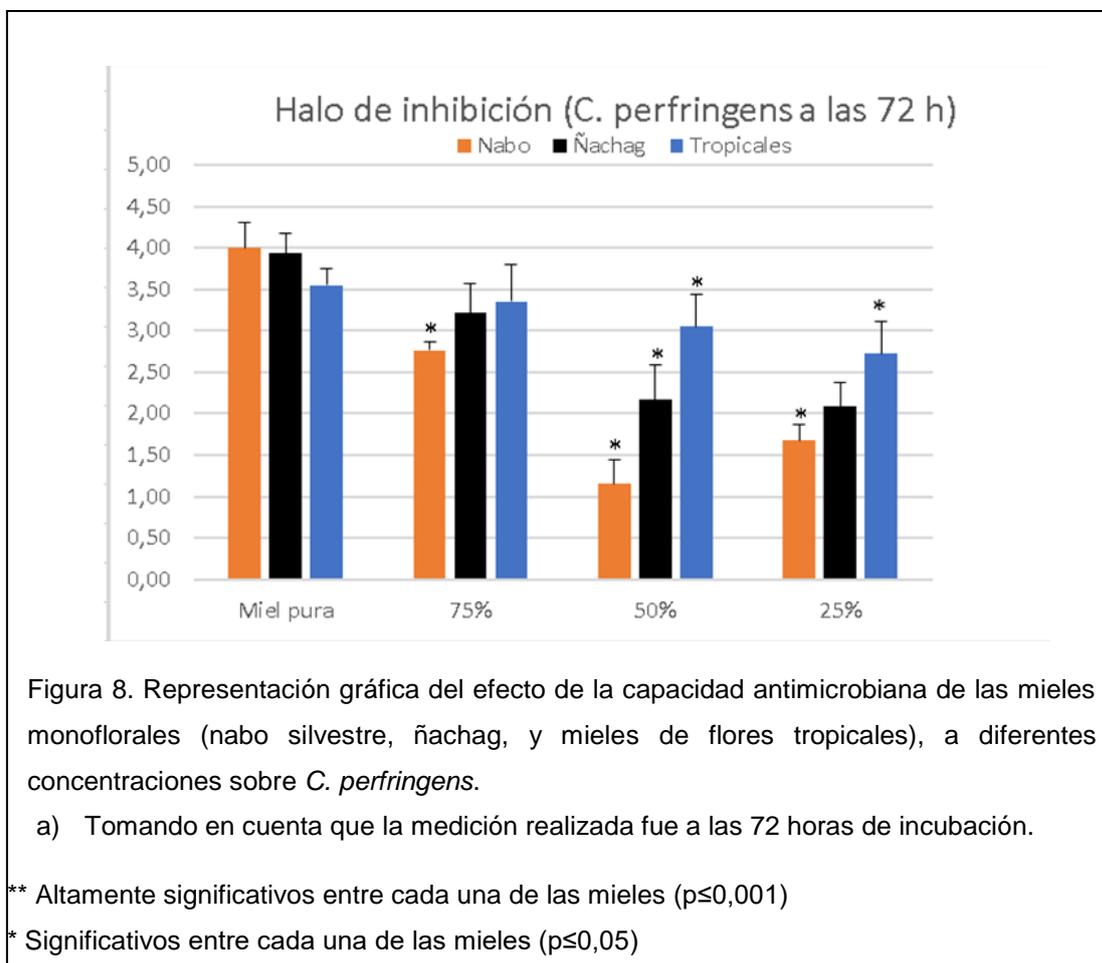
De acuerdo a la figura 5, los tres tipos mieles en el estudio, presentan inhibición de crecimiento, en la cepa *P. aeruginosa*, después de la medición a las 72 horas de incubación. Sin embargo, la miel de nabo silvestre, a las concentraciones del 100%, 75%, y 25% mostró un menor efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano ( $p \leq 0,05$ ) en comparación con las mieles de ñachag y mieles tropicales. La miel de ñachag, a una concentración de 100% (miel pura), mostró el mayor efecto inhibitorio, difiriendo significativamente ( $p \leq 0,05$ ) en comparación con la miel de flores tropicales y de Nabo, mientras que, a las concentraciones de 25, 50 y 75 % las mieles de flores tropicales y ñachag no mostraron diferencia significativa entre sí.



En la figura 6, se evidencia que los tres tipos mieles en el estudio, presentan inhibición de crecimiento en la cepa *C. perfringens*, después de la medición a las 8 horas de incubación. De acuerdo a estos resultados la miel de nabo presentó el menor efecto inhibitorio en comparación los otros tipos de mieles siendo estadísticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ) en el caso de la miel pura y altamente significativo ( $p \leq 0,001$ ) para las concentraciones de 75, 50 y 25 %. En el caso, la miel de ñachag y flores tropicales a una concentración del 100%, no presentaron diferencias significativas demostrando un rango de inhibición similar entre ellas

Por otra parte, la miel de Ñachag y la miel de flores tropicales, a las concentraciones de 75, 50 y 25%, mostraron una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) con los mejores resultados en la miel de flores tropicales, mientras que la miel de ñachag y flores tropicales, a una concentración del 100% presentaron

el mayor efecto antimicrobiano sobre *C. perfringens*, en relación con todas las demás concentraciones.



Según la figura 7, los tres tipos mieles en el estudio, presentan inhibición de crecimiento, en la cepa *C. perfringens*, después de la medición a las 72 horas de incubación. Según estos resultados las mieles de nabo, ñachag y flores tropicales, a una concentración del 100%, no mostraron diferencias significativas entre ellas. A las concentraciones del 75, 50 y 25%, la miel de nabo, mostró los valores más bajos de inhibición del crecimiento bacteriano difiriendo significativamente del resto de las mieles ( $p \leq 0,05$ ), mientras que la miel de ñachag y de flores tropicales a la concentración del 75% presentaron un efecto inhibitorio similar entre ellas. Por otra parte, a la concentración del 25 %, la miel de flores tropicales presentó los mejores efectos inhibitorios,

diferiendo significativamente ( $p \leq 0,05$ ), en comparación con el resto de las mieles.

Tabla 8. Media de los diámetros de los halos de inhibición de las muestras de miel de (Ñachag, Nabo y flores tropicales) analizadas sobre cepas de hongos y levaduras a las 8 h y 72 h después de la exposición a la miel.

<b>Tiempo</b>	<b>Cepa</b>	<b>Tipo de Miel</b>	<b>Miel pura</b>	<b>25%</b>	<b>50%</b>	<b>75%</b>
8 h	<i>A.Brasiliensis</i>	Nabo	0	0	0	0
8 h	<i>A.Brasiliensis</i>	Ñachag	0	0	0	0
8 h	<i>A.Brasiliensis</i>	Tropicales	0	0	0	0
<b>Tiempo</b>	<b>Cepa</b>	<b>Tipo de Miel</b>	<b>Miel pura</b>	<b>25%</b>	<b>50%</b>	<b>75%</b>
72 h	<i>A.Brasiliensis</i>	Nabo	0	0	0	0
72 h	<i>A.Brasiliensis</i>	Ñachag	0	0	0	0
72 h	<i>A.Brasiliensis</i>	Tropicales	0	0	0	0
<b>Tiempo</b>	<b>Cepa</b>	<b>Tipo de Miel</b>	<b>Miel pura</b>	<b>25%</b>	<b>50%</b>	<b>75%</b>
8 h	<i>C. tropicalis</i>	Nabo	0	0	0	0
8 h	<i>C. tropicalis</i>	Ñachag	0	0	0	0
8 h	<i>C. tropicalis</i>	Tropicales	0	0	0	0
<b>Tiempo</b>	<b>Cepa</b>	<b>Tipo de Miel</b>	<b>Miel pura</b>	<b>25%</b>	<b>50%</b>	<b>75%</b>
72 h	<i>C. tropicalis</i>	Nabo	0	0	0	0
72 h	<i>C. tropicalis</i>	Ñachag	0	0	0	0
72 h	<i>C. tropicalis</i>	Tropicales	0	0	0	0

Como se puede observar en la tabla 8, ninguna de las mieles dentro del estudio, resultaron ser efectivas en su acción fungicida frente a las cepas *A. Brasiliensis* y *C. tropicalis*.

#### 4.1 Discusión

De acuerdo a los resultados antes mencionados, los 3 tipos de mieles monoflorales, ejercen su efecto inhibitorio ante *S. aeruginosa* a las 8 horas y 72 horas de incubación, e igualmente en *C. perfringens* y *aeruginosa*. Se pudo observar como en la mayoría de los casos que a medida que la concentración de las mieles aumenta, mayor será su efecto antimicrobiano.

No existen datos sobre las propiedades físico-químicas y propiedades biológicas de las mieles de ñachag, nabo silvestre y flores tropicales, que pueden estar correlacionadas con el efecto antimicrobiano de la miel. Según (Estrada, H., Gamboa, M., Chaves, C. y Arias, 2005), las propiedades de inhibición antimicrobiana de la miel, en concentraciones mayores, se le atribuyen a la alta osmolaridad, así como su acidez. Debido, a esto en el estudio realizado las muestras que tuvieron el mejor efecto antimicrobiano, fueron las concentraciones al 100%.

Se ha planteado que dentro de los principales componentes de la miel de abeja que le permiten ejercer su capacidad antimicrobiana son: el peróxido de hidrógeno, los compuestos fenólicos, el pH y la presión osmótica. Sin embargo, de acuerdo, con varios autores (Alvarez-Suarez et al., 2010), la propiedad que más induce a la inhibición de los microorganismos, es la acción del peróxido de hidrógeno y la osmolaridad. Por otro, lado no solo estos factores podría ayudar a la inhibición antimicrobiana, sino el mismo origen floral y entomológico de la miel (Anyanwu, 2012), las cuales pueden estar relacionadas con la capacidad antimicrobiana observadas en las muestras en estudio, si bien se deben realizar otras determinaciones que permitan determinar el aporte de cada uno de sus constituyentes al efecto antimicrobiano total.

Por otra parte, las tres mieles estudiadas no fueron capaces de inhibir el crecimiento en las cepas de *A. brasiliensis* y *C. tropicales*. Al igual, que estudios previamente reportados (Zamora, L., Arias, 2011), se sugiere que la falta de capacidad de inhibición de crecimiento en hongos y levaduras por parte de la miel de abeja, está relacionada con los propios mecanismos antes mencionados, los cuales no ejercen ningún tipo de efecto inhibitorio en hongos y levaduras, al punto que condiciones como el alto por ciento de azúcares y el pH ácido (3,4 a 6,1) de la miel pudieran favorecer el crecimiento de hongos y levaduras en contraste con la inhibición que producen en bacterias (Zamora y Arias, 2011).

## 4.2. Conclusiones y recomendaciones

### 4.2.1 Conclusiones

- Las mieles monoflorales de ñachag, nabo silvestre y flores tropicales, presentan efectos inhibitorios de crecimiento en las bacterias *P. aeruginosa* y *C. perfringens*. A diferentes concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) capaces de ejercer un efecto de inhibición en el crecimiento. Las que presentaron el mejor efecto antimicrobiano fueron las mieles a una concentración del 100 % y del 75%.
- Existe una relación entre el origen floral y las propiedades antimicrobianas de las mieles, donde las mieles de nabo fueron las que demostraron un menor efecto antimicrobiano en comparación con las mieles de ñachag y mieles tropicales.
- Las mieles monoflorales de ñachag, nabo silvestre, y flores tropicales, no exhiben ningún tipo de efecto antifúngico ante las cepas del hongo *A. brasiliensis* y la levadura *Candida tropicalis*, rechazando la hipótesis planteada al inicio del estudio, sólo en estos dos microorganismos.

#### 4.2.2 Recomendaciones

- En relación a los resultados de este estudio se recomendaría realizar estudios más profundos que abarquen otros tipos de mieles, así como otros patógenos de interés veterinario. Por otra parte, se recomienda ampliar estos estudios *in vitro* a estudios *in vivo* para demostrar el verdadero efecto antimicrobiano en las condiciones de crianza de cada una de las especies de interés veterinario.
- En función a los resultados, las mieles de ñachag y las mieles tropicales, debido a su gran efecto antimicrobiano, se deberían considerar para futuras investigaciones microbiológicas y en diferentes cepas bacterianas a las ya presentadas en este estudio.

## 10. REFERENCIAS

- Acha, P., y Szyfres, B. (2001). *Bacteriosis y Micosis. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. (3<sup>era</sup> edición). Vol.1. Washington, Estados Unidos: Organización Panamericana de la Salud. Recuperado el 1 de Enero del 2016 de [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=19161&Itemid=](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=19161&Itemid=)
- Agronegociosecuador. (s.f.). *Buscan aumentar la producción de miel en Manabí*. Recuperado el 18 de Abril del 2016 de [http://agronegociosecuador.ning.com/notes/Buscan\\_aumentar\\_la\\_produccion\\_de\\_miel\\_en\\_Manab%C3%AD](http://agronegociosecuador.ning.com/notes/Buscan_aumentar_la_produccion_de_miel_en_Manab%C3%AD)
- Ajibola, A., Chamunorwa, J., y Erlwanger, K. (2012). *Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth*. *Nutr Metab*, 9(1), 61.
- Alvarez-Suarez, J., Giampieri, F., y Battino, M. (2013). *Honey as a source of dietary antioxidants: structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases*. *Current medicinal chemistry*, 20(5), 621–38.
- Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Díaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F. y 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.
- Anyanwu, C. (2012). *Investigation of in vitro antimicrobial activity of honey*. *Journal of medicine of plants*. 6(18), 3512–3516.
- Bang, L., Bunting, C., Molan, P. (2003). *The effect of dilution on the rate of hydrogen peroxide production in honey and its implications for wound healing*. *The Journal of alternative and complementary medicine*, 9(2), 267–273.
- Beliz, H., Grosh, W. y Schieberle, P. (2004). *Food Chemistry*. (4<sup>ta</sup> edición). Heidelberg, Alemania: Springer Science.

- Bennet, J. (2010). *An overview of the genus Aspergillus*. Norfolk, Inglaterra: Caiser Academic Press. Recuperado el 20 de Abril del 2016 de <http://www.horizonpress.com/openaccess/pdf/aspergillus1.pdf>
- BotanicalOnline. (s.f.-a). *El Nabo silvestre*. Recuperado 19 de mayo de 2016, de [http://www.botanical-online.com/nabo\\_brassica\\_rapa.htm](http://www.botanical-online.com/nabo_brassica_rapa.htm)
- BotanicalOnline. (s.f.-b). *Propiedades del laurel*. Recuperado de <http://www.botanical-online.com/medicinalslaurusnobiliscastella.htm>
- Boukraâ, L. (2013). *Honey in Traditional and Modern Medicine*. Boca Ratón, Estados Unidos: CRC Press.
- Boundless. (s.f.). *Kirby-Bauer Disk Susceptibility Test*. Recuperado 1 de enero del 2016 de <https://www.boundless.com/microbiology/textbooks/boundless-microbiology-textbook/antimicrobial-drugs-13/measuring-drug-susceptibility-157/kirby-bauer-disk-susceptibility-test-791-6152/>
- Calderone, R. y Clacy, C. (2011). *Candida and candidiasis*. (2<sup>da</sup> edición). Baltimore, Estados Unidos: American Society for Microbiology Press.
- Estrada, H., Gamboa, M., Chaves, C. y Arias, M. (2005). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Salmonella enteritidis, Listeria monocytogenes y Aspergillus niger*. Archivos latinoamericanos de nutrición, 55(2), 167–171.
- FAO. (s.f.). *La apicultura ayuda a crear sistemas de vida sostenibles*. Recuperado 23 de diciembre del 2015 de <http://www.fao.org/docrep/008/y5110s/y5110s02.htm>
- Gibson, D., Yang, Q., Kerekes, D. y Schultz, G. (2014). *Medical honey and silver dressings do not interfere with each others key functional attributes. Wounds: a compendium of clinical research and practice*. Wounds, 26(11):309-316.
- Google. (s.f.). Mapa de la provincia de Bolívar, Ecuador en Google maps. Recuperado 18 de abril del 2016, de <https://www.google.com.ec/maps/place/Bol%C3%ADvar/@-1.5524865,->

80.1723909,8z/data=!4m5!3m4!1s0x91d31633414f2155:0xaad69730e0ac04bc!8m2!3d-1.5696244!4d-79.1096901

Google. (s.f.-b). Mapa de la Provincia de Pichincha. Recuperado 18 de abril de 2016, de [https://www.google.com.ec/maps/place/Pichincha/@-0.1654786,-](https://www.google.com.ec/maps/place/Pichincha/@-0.1654786,-78.559279,10.5z/data=!4m5!3m4!1s0x91d5708325efe437:0x94cead1b5e2aa19e!8m2!3d-0.1464847!4d-78.4751945)

[78.559279,10.5z/data=!4m5!3m4!1s0x91d5708325efe437:0x94cead1b5e2aa19e!8m2!3d-0.1464847!4d-78.4751945](https://www.google.com.ec/maps/place/Pichincha/@-0.1654786,-78.559279,10.5z/data=!4m5!3m4!1s0x91d5708325efe437:0x94cead1b5e2aa19e!8m2!3d-0.1464847!4d-78.4751945)

Granados, R., Villaverde, M. (1997). *Microbiología*. Madrid, España: Editorial Paraninfo.

Haskell, S. (2008). *Blackwells five minute veterinary consult: Ruminant*. (1<sup>era</sup> edición). Iowa, Estados Unidos: John Wiley & Sons.

Hudzicki, J. (2010). *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*. Recuperado 20 de mayo del 2016 de <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol>

Jaffé, R., Pope, N., Torres-Carvalho, A., Madureira, U., Blochtein, B., Lopes de Carvalho, A., Almeida, G., Magalhães, B., Menezes, C., Ribeiro, M., Venturieri, G., Imperatriz-Fonseca, V. (2015). *Bees for development: Brazilian survey reveals how to optimize stingless beekeeping*. PLoS ONE, 10(3), 1–21.

Jenkins, R. y Cooper, R. (2012). *Improving Antibiotic activity against wound pathogens with Manuka Honey In Vitro*. PLoS ONE, 7(9): e45600.

Kurtzman, C., Fell, J., Boekhout, T. (2011). *The yeast: A taxonomic study*. (5<sup>ta</sup> edición). San Diego, Estados Unidos: Elsevier.

Kwakman, P. y Zaat, S. (2012). *Antibacterial components of honey*. IUBMB Life, 64(1), 48–55.

Kwakman, P., De Boer, L., Ruyter-Spira, C., Creemers-Molenaar, T., Helsper, J., Vandenbroucke-Grauls, C. y Te Velde, A. (2011). *Medical-grade honey enriched with antimicrobial peptides has enhanced activity against antibiotic-resistant pathogens*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 30(2), 251–257.

- Langroudi, R. (2015). *Isolation, Specification, Molecular Biology Assessment and Vaccine Development of Clostridium in Iran: A Review*. International Journal of Enteric Pathogens, 3(4).
- Larone, D. (2002). *Medically Important Fungi: A Guide to Identification* (4ta edición). Washington, Estados Unidos: ASM Press.
- Li, J., Adams, V., Bannam, T. L., Miyamoto, K., Garcia, J. P., Uzal, F. A. y McClane, B. A. (2013). *Toxin plasmids of Clostridium perfringens*. Microbiology and molecular biology reviews, 77(2), 208–33.
- Mackenzie, A. (2013). *Beekeeping: A step by step guide to setting up and maintaining a hive*. Springville, Estados Unidos: Cedar Fort.
- MAGAP. (s.f.). *MAGAP capacita en manejo y control de enfermedades de la abeja*. Recuperado 30 de abril del 2016, de <http://www.agricultura.gob.ec/magap-capacita-en-manejo-y-control-de-enfermedades-de-la-abeja/>
- Mandal, M., y Mandal, S. (2011). *Honey: Its medicinal property and antibacterial activity*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 1(2), 154–160.
- ManyiLoh, C., Clarke, A. y Ndip, R. (2011). *Comparison of the VersaTrek and BACTEC MGIT 960 systems for the contamination rate, time of detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens*. African Journal of Microbiology Research, 5(9), 844–852.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M. y Cullinane, A. (2013). *Clinical Veterinary Microbiology*. (2<sup>da</sup> edición). St. Louis, Estados Unidos: Mosby Elsevier.
- McVey, D., Kennedy, M. y Chengappa, M. (2013). *Veterinary Microbiology*. (3<sup>era</sup> edición). Iowa, Estados Unidos: John Wiley & Sons.
- Mijanur Rahman, M., Gan, S., y Khalil, M. (2014). *Neurological effects of honey: Current and future prospects. Evidence-based. Complementary and Alternative Medicine*, Vol.2014.
- Mizrahi, A. y Lensky, Y. (2013). *Bee Products; Properties, Applications, and Apitherapy*. New York, Estados Unidos: Springer Science.
- Motarjemi, Y. y Lelieveld, H. (2013). *Food Safety Management*. (1era edición). San Diego, Estados Unidos: Academic Press.

- Nagoba, S. (2009). *Microbiology for Physiotherapy Students*. New Delhi, India: BI Publications Pvt Ltd.
- National Honey Board. (s.f.). *A Reference Guide to Nature's Sweetener*. Recuperado el 10 de Marzo del 2016 de <http://www.honey.com/images/downloads/refguide.pdf>.
- OIE. (s.f.). *Resistencia a los Antimicrobianos*. Recuperado 20 de noviembre del 2015 de <http://www.oie.int/doc/ged/D14036.PDF>
- OMS. (s.f.). *Resistencia a los Antimicrobianos*. Recuperado 20 de noviembre del 2015 de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- PFAF (s. f.). *Ruta graveolens - L*. Recuperado 19 de mayo del 2016 de <http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Ruta+graveolens>
- Pineda, T. (2010). *Producción y análisis financiero de la obtención de jalea real de abejas por el método doolittle*. Escuela Politécnica Nacional. Recuperado el 24 de Mayo del 2016 de <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/1899/1/CD-2805.pdf>
- Quinn, P., Markey, B., Leonard, F., FitzPatrick, E. y Fanning, S. (2015). *Concise Review of Veterinary Microbiology*. (2da edición). Iowa, Estados Unidos: John Wiley & Sons.
- Quinn, P., Markey, Q., Leonard, F., FitzPatrick, E. y Fanning, S. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. (1<sup>era</sup> edición). Iowa, Estados Unidos: Wiley-Blackwell.
- Apireal. (s.f.). *Miel de ñachag*. Recuperado 19 de mayo del 2016, de <http://www.apireal.com/>
- Samata, I. (2015). *Veterinary Mycology*. (1<sup>era</sup> edición). New Delhi, India: Springer.
- Santana, L., D., Luiz, S. y Ferreira, M. (2011). *Aerobic and anaerobic bacteria and Candida species in crude milk*. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 3(8), 206-212.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D., y Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance*. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 288–305.
- Sirois, M. (2012). *Elsevier's veterinary assisting textbook*. St. Louis, Estados Unidos: Elsevier Health Science.

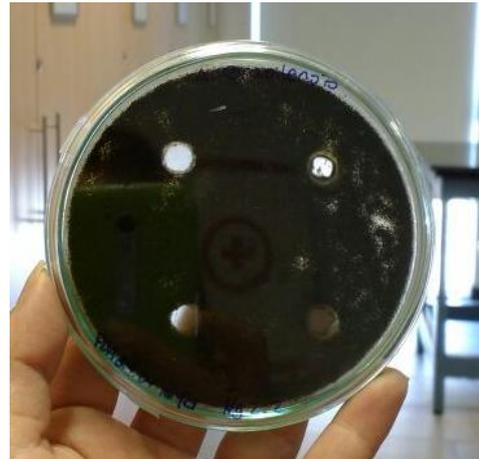
- Suarez, A. (1990). *Un programa nacional de investigadores para la producción animal en el Ecuador*. Recuperado el 14 de Abril del 2016 de <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/1123/1/T-SENESCYT-0290.pdf>
- Tomasik, P. (2003). *Chemical and Funcional properties of food saccharides*. Boca Raton, Estados Unidos: CRC Press.
- Zamora, L. y Arias, M. (2011). *Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón*. Rev Biomed, 22(2),59-66.

**ANEXOS**

## Anexo. 1 Fotografías de los halos de inhibición



Halos de inhibición de la miel de flores tropicales, sobre *S. aeruginosa*.



*A. brasiliensis*, sin halos de inhibición, después de 72 horas.



Halos de inhibición de la miel de ñachag, sobre *C. perfringens*.



Halos de inhibición de la miel de flores tropicales, sobre *C. perfringens*.

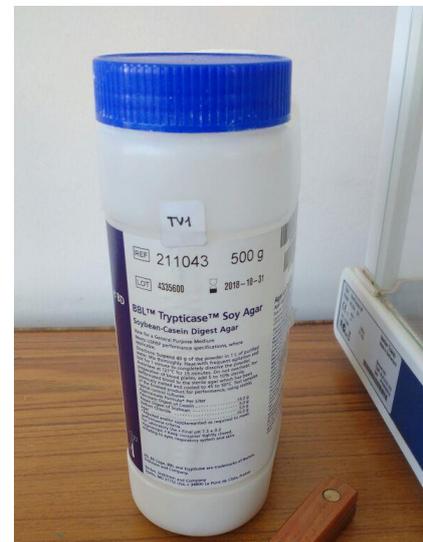
## MATERIALES UTILIZADOS



Cámara de flujo laminar



Medio de cultivo – Dextrosa agar papa



Medio de cultivo – Agar tripticasa soya



Medio de cultivo – Agar dextrosa Sabourand