

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

TESIS

**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE DOS MIELES DE
MELIPONINOS Y CARACTERIZACIÓN DE SUS EXTRACTOS
PROTEICOS SOBRE *Salmonella* Typhimurium ATCC13311”**

PARA OPTAR AL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Q.A. MÓNICA ISABEL MORALES CORTÉS

ASESOR:

DRA. ELIZABETH DE LA LUZ ORTIZ VÁZQUEZ

COASESOR:

M. C. JESÚS MANUEL RAMÓN SIERRA

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO.

15 DE DICIEMBRE DE 2017



DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
No. DE OFICIO: X-510/2017

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

MÉRIDA, YUCATÁN A 06 DE DICIEMBRE DE 2017

C. MORALES CORTÉS MÓNICA ISABEL
Pasante de Maestría en Ciencias de los
Alimentos y Biotecnología
P r e s e n t e.

De acuerdo al fallo emitido por su asesor la Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez, co-asesorada por el M.C. Jesús Manuel Ramón Sierra y la comisión revisora integrada por la Dra. Marianne Soledad Luna Rivero, la Dra. Sara Elena Solís Pereira y el Dr. Jesús Alejandro Yam Puc, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

"ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE DOS MIELES DE MELIPONINOS Y CARACTERIZACIÓN DE SUS EXTRACTOS
PROTEICOS SOBRE *Salmonella TYPHIMURIUM ATCC13311*"

ATENTAMENTE
IN HOC SIGNO VINCES

M.C. DANIEL ARCÁNGEL LÓPEZ SAURÍ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Archivo
DALs/fja



S. E. P.

INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE MÉRIDA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



Dedicatoria

Para las abejas.

Para todos los que no logramos resistir el encanto de su mundo
y vamos por la vida proclamando sus virtudes.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por hacer posible los estudios de Maestría presentados en este trabajo, con la beca 587456.

Al Tecnológico Nacional de México – Instituto Tecnológico de Mérida y al Posgrado en Ciencias de los Alimentos y Biotecnología, por las instalaciones prestadas y la educación brindada.

Al Jurado asignado, por el tiempo dedicado y sus valiosas sugerencias.

A la Dra. Elizabeth Ortiz, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo. Le agradezco su apoyo, comprensión y dedicación para conmigo, que ayudaron a concluir este proyecto con éxito a pesar de todos los contratiempos.

Al M. en C. Jesús Ramón Sierra, por el apoyo incondicional, el entusiasmo, su amistad y por no dejar que decayeran mis ánimos. Muchas gracias por tomar el timón y guiar este trabajo hacia buen puerto.

A la Dra. Marianne Luna, por sus críticas, comentarios y observaciones que fueron fundamentales para el replanteamiento de objetivos y la redacción de la tesis.

A mis profesores de la Maestría, por su dedicada labor docente. En especial a los Doctores Sara Solís, Susana Rincón, Denis Magaña y Alejandro Yam, con quienes compartí agradables momentos.

A todos mis amigos y compañeros del Laboratorio de Microbiología Aplicada y Molecular. Gracias por compartir sus conocimientos y ser solidarios conmigo, fue muy grato y divertido trabajar con ustedes.

A mis amigos de otros laboratorios, por las reuniones, las comidas, las fiestas que nos amanecemos, las risas y las enseñanzas. A Hiram, por todo.

A mis compañeros de generación: Nidia, Rubiel, Jair, Enrique, Santos, Carlos y Paola. Por su invaluable amistad y cariño. No tengo palabras suficientes para expresar lo afortunada que me siento de haber recorrido este camino juntos. Estoy muy orgullosa de cada uno de ustedes, los quiero mucho.

A Gilberto, Agustín y José Z., por ofrecerme su amistad cuando más la necesitaba, por ayudarme, acompañarme y estar al pendiente de mí.

A Janeth, mi compañera de aventuras, mi gran amiga. Gracias por ser mi familia en estas tierras desconocidas, por compartir este sueño y hacerlo fantástico. Eres parte fundamental de este logro. Te quiero mucho.

A aquellas personas que conocí en este viaje y que hicieron mi estancia acogedora y feliz. Muchas gracias a la Sra. María Elena Medina y al Sr. Orlando Cerón, así como a su familia, por recibirme en su casa.

A mis padres Isabel y Alejandro, por dejarme hacer y darme el impulso y el soporte para lograrlo; a Manuel y Emilio, porque sé que siempre están conmigo. A toda mi familia y anexos, por su amor y sus ánimos.

A mis amigos, los que me acompañan no importando distancia, ni tiempo, ni circunstancias: Tania, David, Shei, Lud, Marianini, Sooz, Ced, Néstor, Chivis, Gina, Lola, Gabi, Javis BS. Gracias. Son los mejores.

Por último, quisiera agradecer especialmente a Javier Pérez, por incentivar me a tomar este reto; a mí misma, por tener el valor y las ganas de realizar mis sueños y metas, y a Dios, por darme las oportunidades y herramientas para lograrlo.

Contenido

Resumen	1
Abstract	2
Capítulo 1. Introducción	3
Capítulo 2. Antecedentes.....	5
2.1 <i>Melipona</i>	5
2.1.1 Taxonomía y distribución geográfica.....	5
2.1.2 <i>Melipona beecheii</i>	6
2.1.3 <i>Melipona yucatanica</i>	7
2.1.4 Importancia de las abejas sin aguijón y la meliponicultura en México.....	8
2.2 Miel	9
2.2.1 Composición	10
2.2.2 Azúcares.....	10
2.2.3 Agua	10
2.2.4 Vitaminas y Minerales.....	10
2.2.5 Ácidos.....	11
2.2.6 Proteínas	11
2.3 Factores antimicrobianos de la miel	11
2.3.1 Osmolaridad	11
2.3.2 Acidez y pH.....	12
2.3.3 Peróxido de hidrógeno.....	12
2.3.4 Compuestos fenólicos, flavonoides y aromáticos.....	13
2.3.5 Proteínas	14
2.4 <i>Salmonella</i>	15
2.4.1 Clasificación	15
2.4.2 Salmonelosis	16
2.4.3 Infección gastrointestinal	17
2.4.4 Mecanismos de virulencia	19
2.4.5 Resistencia a antibióticos.....	19
Capítulo 3. Justificación.....	22

Capítulo 4. Hipótesis	23
Capítulo 5. Objetivos.....	24
5.1 Objetivo general.....	24
5.2 Objetivos particulares	24
Capítulo 6. Materiales y métodos.....	25
6.1 Materiales biológicos	25
6.2 Curva de crecimiento.....	26
6.3 Extracción de los compuestos proteicos de las mieles de <i>Melipona</i>	26
6.4 Determinación de la concentración proteica en las mieles de <i>Melipona</i>	26
6.5 Determinación del perfil proteico por electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)	27
6.6 Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar .	27
6.7 Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria por el método de microdiluciones	27
6.8 Curvas de efecto antibacteriano por absorbancia	28
6.9 Evaluación del efecto del pH y la temperatura en la actividad antibacteriana de los extractos proteicos	28
Capítulo 7. Resultados y discusión.....	29
7.1 Curva de crecimiento de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	29
7.2 Extracción de proteínas, cuantificación y perfil proteico	30
7.3 Actividad antibacteriana. Método de difusión en agar con disco.....	33
7.4 Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad de los extractos proteicos.....	39
7.5 Actividad antimicrobiana. Concentración Mínima Inhibitoria	45
7.6 Curvas de efecto antibacteriano por absorbancia	45
Capítulo 8. Conclusiones.....	50
Capítulo 9. Perspectivas	51
Bibliografía.....	52
Otras referencias.....	62

Índice de Figuras

Figura 1. Clasificación taxonómica de <i>M. beecheii</i> , <i>M. yucatanica</i> y <i>A. mellifera</i>	5
Figura 2. Distribución de abejas sin aguijón en el continente americano.....	6
Figura 3. <i>Melipona beecheii</i> de Yucatán.....	7
Figura 4. <i>Melipona yucatanica</i>	7
Figura 5. Ah Mucen Kab.	8
Figura 6. Diagrama de la metodología.....	25
Figura 7. Curva de crecimiento de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> ATCC13311.....	29
Figura 8. Curva estándar de albúmina sérica bovina para el método	30
Figura 9. Perfil proteico del extracto de proteínas de la miel de <i>Melipona beecheii</i>	31
Figura 10. Perfil proteico del extracto de proteínas de la miel de <i>Melipona yucatanica</i> . ..	32
Figura 11. Comparativo de los perfiles electroforéticos de los extractos proteicos de las mieles de <i>M. yucatanica</i> y <i>M. beecheii</i>	33
Figura 12. Difusión en agar de miel de <i>M. beecheii</i>	34
Figura 13. Disminución del diámetro de los halos de inhibición de la miel de <i>M. beecheii</i> con respecto al tiempo a diferentes concentraciones % (v/v).	35
Figura 14. Difusión en agar de miel de <i>M. yucatanica</i>	35
Figura 15. Difusión en agar de los extractos proteicos.....	37
Figura 16. Disminución del diámetro de los halos de inhibición del extracto proteico de la miel de <i>M. yucatanica</i> con diferentes cantidades de proteína total (μg).	38
Figura 17. Disminución del diámetro de los halos de inhibición del extracto proteico de la miel de <i>M. beecheii</i> con diferentes cantidades de proteína (μg).	38
Figura 18. Efecto de la temperatura en la actividad antibacteriana de los extractos proteicos de las mieles.	40
Figura 19. Difusión en disco de extractos proteicos de <i>M. yucatanica</i> (EPMY) a diferentes condiciones de pH contra <i>Salmonella</i> Typhimurium.	40
Figura 20. Difusión en disco de extractos proteicos de <i>M. beecheii</i> (EPMB) a diferentes condiciones de pH contra <i>Salmonella</i> Typhimurium.	41
Figura 21. Extractos proteicos de mieles a diferentes pH.....	43

Figura 22. Perfil electroforético del extracto proteico de <i>M. beecheii</i> obtenido a diferentes pH.....	44
Figura 23. Perfil electroforético del extracto proteico de <i>M. yucatanica</i> obtenido a diferentes pH.....	44
Figura 24. Efecto de un agente bactericida (ciprofloxacino) y un agente bacteriostático (tetraciclina) sobre <i>S. Typhimurium</i>.	46
Figura 25. Efecto de la miel de <i>M. beecheii</i> a 0.5, 1 y 2 veces la CMI sobre <i>S. Typhimurium</i>.....	46
Figura 26. Efecto de la miel de <i>M. yucatanica</i> a 0.5, 1 y 2 veces la CMI sobre <i>S.</i>	47
Figura 27. Efecto del extracto proteico de <i>M. beecheii</i> (PB) a 1 y 2 veces la CMI sobre <i>S. Typhimurium</i>.....	47
Figura 28. Efecto del extracto proteico de <i>M. beecheii</i> (PB) a 1 y 2 veces la CMI sobre <i>S. Typhimurium</i>, durante 48 horas.....	48
Figura 29. Efecto del extracto proteico de <i>M. yucatanica</i> (PB) a 1 y 2 veces la CMI sobre <i>S. Typhimurium</i>.....	49
Figura 30. Porcentaje de UFC/mL de <i>S. Typhimurium</i>, en presencia del extracto proteico de <i>M. yucatanica</i> (PY) a 2 veces la CMI.	49

Índice de Tablas

Tabla 1. Comparación de algunos parámetros fisicoquímicos experimentales de <i>M. beecheii</i> con estándares sugeridos para mieles de abejas sin aguijón.....	9
Tabla 2. Pesos moleculares (kDa) de las bandas de los extractos proteicos.....	33
Tabla 3. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI)	45

Resumen

El género *Salmonella* es conocido por provocar de diversas enfermedades, dentro de las cuales se encuentra la salmonelosis, enfermedad gastrointestinal causante de diarreas. Uno de los serotipos más importantes responsables de salmonelosis es *Salmonella* Typhimurium. Estas infecciones reciben tratamientos farmacológicos con diversos agentes; sin embargo, la generación de mecanismos de resistencia a antibióticos por parte de esta bacteria, ha provocado la búsqueda de nuevas alternativas, especialmente de origen natural, para su tratamiento. La miel de abejas sin aguijón, como la proveniente del género *Melipona*, ha sido empleada desde la antigüedad en el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas las de índole digestivo. Así mismo, diversos estudios afirman que existen varios factores de la composición de la miel a los que se les atribuye el efecto antibacteriano, entre los que se encuentran las proteínas; estas proteínas podrían estar contribuyendo a la actividad antibacteriana. Por tal motivo, el objetivo general de este trabajo es evaluar la actividad antimicrobiana las mieles de dos especies de meliponinos (*Melipona beecheii* y *Melipona yucatanica*), así como de sus correspondientes extractos proteicos sobre el crecimiento de *Salmonella* Typhimurium ATCC13311. Como resultados se obtuvieron concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para la miel de *M. beecheii* de 10%, para su extracto proteico una CMI de 200µg de proteína total/mL; para la miel de *M. yucatanica* la CMI resultó de 24%, mientras que en el caso del extracto proteico fue de 60µg de proteína total/mL. Por otro lado, se realizaron ensayos de difusión en agar con disco, donde el extracto proteico de la miel de *M. yucatanica* mantuvo la actividad antibacteriana a diferentes pH (5.7, 7 y 8) y después de un tratamiento térmico a 95°C. El extracto proteico de la miel de *M. beecheii* sólo mostró actividad a pH 7 y sin tratamiento térmico. Se hicieron curvas de muerte tanto con las mieles como con sus extractos y se compararon con dos antibióticos, observándose una actividad de tipo bacteriostática para la miel de *M. beecheii* y una actividad bactericida para la miel de *M. yucatanica*. Como conclusión, tanto las mieles analizadas como sus correspondientes extractos proteicos si tienen un efecto antibacteriano sobre *S. Typhimurium*, afectando su crecimiento; el componente proteico de las mieles contribuye como factor antibacteriano.

Abstract

The genus *Salmonella* is known to cause various diseases, among which is salmonellosis, gastrointestinal disease causing diarrhea. One of the most important serotypes responsible for salmonellosis is *Salmonella* Typhimurium. These infections receive pharmacological treatments with various agents; However, the generation of antibiotic resistance mechanisms by this bacterium has led to the search for new alternatives, especially of natural origin, for its treatment. The honey of stingless bees, such as that of the genus *Melipona*, has been used since ancient times in the treatment of various diseases, including those of a digestive nature. Likewise, several studies claim that there are several factors of the composition of honey to which the antibacterial effect is attributed, among which are the proteins; these proteins could be contributing to the antibacterial activity. For this reason, the general objective of this work is to evaluate the antimicrobial activity of honey from two meliponin species (*Melipona beecheii* and *Melipona yucatanica*), as well as their corresponding protein extracts on the growth of *Salmonella* Typhimurium ATCC13311. As results, minimal inhibitory concentrations (MIC) were obtained for honey of *M. beecheii* of 10%, for its protein extract an MIC of 200µg of total protein / mL; for the *M. yucatanica* honey the MIC was 24%, while in the case of the protein extract it was 60µg of total protein / mL. On the other hand, disk diffusion assays were carried out, where the protein extract of *M. yucatanica* honey maintained the antibacterial activity at different pH (5.7, 7 and 8) and after a thermal treatment at 95 ° C. The protein extract of *M. beecheii* honey showed activity only at pH 7 and without thermal treatment. Death curves were made both with the honeys and with their extracts and they were compared with two antibiotics, observing a bacteriostatic activity for the honey of *M. beecheii* and a bactericidal activity for the honey of *M. yucatanica*. In conclusion, both the honeys analyzed and their corresponding protein extracts do have an antibacterial effect on *S. Typhimurium*, affecting its growth; the protein component of honey contributes as an antibacterial factor.

Capítulo 1. Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud, se estima que la salmonelosis afecta anualmente a decenas de millones de personas de todo el mundo provocando más de cien mil defunciones. La salmonelosis es causada por bacterias del género *Salmonella*, teniendo relevancia internacional por ser una de las enfermedades de transmisión alimentaria más comunes y más ampliamente extendidas. Entre los más de 2500 serotipos de *Salmonella enterica*, se encuentra *S. Typhimurium*, que ha sido aislado frecuentemente de pacientes con esta enfermedad (OMS, 2017).

A partir de 1990, se ha observado una prevalencia de la resistencia a antibióticos en diferentes bacterias, lo que es relevante debido a la dificultad de combatir la enfermedad con tratamientos antibacterianos. Se han encontrado cepas de *S. Typhimurium* resistentes a estreptomicina, cefalosporinas, entre otros antibióticos (Glynn *et al.*, 1998; Molbak *et al.*, 1999; Zaidi *et al.*, 2006). La creciente preocupación de los investigadores de la salud ha llevado a que la OMS publique una lista de patógenos prioritarios por ser resistentes a los antibióticos, en la que se encuentran las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana, incluyendo a *Salmonella* en el grupo de prioridad elevada, por presentar una creciente resistencia y producir enfermedades comunes en el ser humano (OMS, 2017).

Por otro lado, la miel de abejas sin aguijón, que se encuentran principalmente en zonas tropicales y subtropicales del mundo como México, Centro y Sudamérica, Australia, África y Asia, es reconocida y utilizada regionalmente como alimento y principalmente como agente curativo (Camargo *et al.*, 1988; Jones, 2013). En la Península de Yucatán se pueden encontrar varias especies de estas abejas, entre las que destacan las abejas del género *Melipona* como es el caso de *M. beecheii* y *M. yucatanica*, que desde la época de los antiguos mayas se ha usado como medicina tradicional debido a sus propiedades cicatrizantes y antimicrobianas que ayudan en el tratamiento de heridas, enfermedades de vías respiratorias, gastrointestinales y oculares. Dentro de las enfermedades gastrointestinales tratadas con miel, destacan la gastritis, cólicos, diarreas e infecciones estomacales (González y Quezada, 2011; Manzo, 2012). Dada la importancia de la salmonelosis y de la prevalencia de la cepa *Typhimurium*, así como la aparición e incremento

de cepas multirresistentes a antibióticos, se propone el uso de alternativas y nuevos compuestos para su tratamiento, que no generen resistencia y que se encuentren al alcance de la población, como es el caso de las mieles de *Melipona*, especialmente *M. beecheii*, que se encuentra ampliamente distribuida en Yucatán.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 *Melipona*

2.1.1 Taxonomía y distribución geográfica

El género *Melipona* pertenece a la tribu *Meliponini* (Figura 1) que está constituido por alrededor de 40 géneros de abejas que producen miel, pero que se distinguen del género *Apis* por diferencias en sus características morfológicas, especialmente por carecer de un aguijón funcional (Camargo *et al.*, 1988). Este tipo de abejas viven comúnmente en huecos de árboles en colonias permanentes (González y Quezada, 2011).

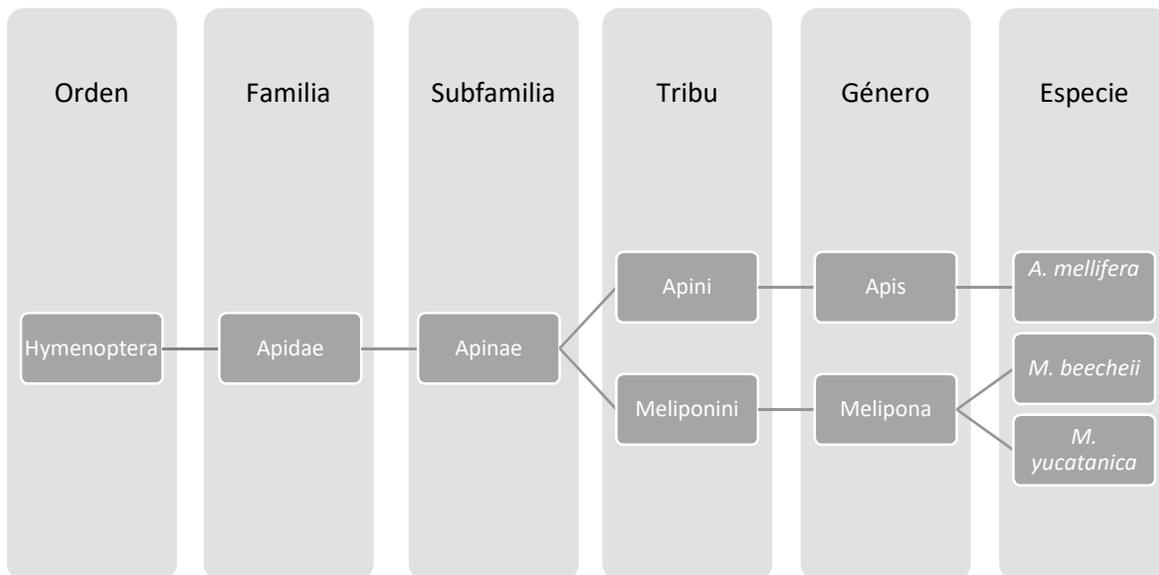


Figura 1. Clasificación taxonómica de *M. beecheii*, *M. yucatanica* y *A. mellifera*.

Los meliponinos se localizan en las regiones tropicales y subtropicales del planeta, principalmente en Centro y Sur de América (Figura 2), África, Oceanía y Asia. En América se han identificado más de 300 especies pertenecientes a 30 géneros diferentes (Quezada-Eúan, 2005).

Ayala (1999) reporta un total de 11 géneros y 46 especies de Meliponini en México. De éstas, al menos 7 especies corresponden al género *Melipona*, siendo *M. beecheii* una de las más estudiadas por su amplia distribución a lo largo del continente americano, abarcando desde Veracruz y Jalisco, en México, hasta Costa Rica (Quezada-Eúan, 2005), y *M. yucatanica* una especie con localidad típica de la Península de Yucatán y el Istmo de Tehuantepec (Ayala, 1999), descrita por primera vez por Camargo, Moure y Roubik en 1988.



Figura 2. Distribución de abejas sin aguijón en el continente americano.
(Baquero y Stamatti, 2007).

2.1.2 *Melipona beecheii*

Melipona beecheii (Figura 3) es una abeja robusta, parecida *A. mellifera*, de entre 9.7 a 10.7 mm de longitud, de color negro y anaranjado, con franjas amarillas en el abdomen, mechones muy densos de pelos anaranjados-rojizos y patas de color negro. Las alas son transparentes y de menor longitud que el abdomen (Ayala, 1999).

Esta abeja es conocida en la región de Yucatán con el nombre de xuna'an kab, “dama de miel” en maya yucateco. Fue de gran importancia antes de que los españoles introdujeran la *A. mellifera*, desarrollándose técnicas para el manejo, cría y aprovechamiento de la miel y la cera (Villanueva, 2013). En la actualidad, se sigue criando a las abejas para su uso como polinizadores en algunos cultivos, además de continuar con la cosecha de miel para diversos usos curativos (Huicochea, 2011).



Figura 3. *Melipona beecheii* de Yucatán.

(Ricardo Ayala).

2.1.3 *Melipona yucatanica*

Es una abeja con una longitud de 8.2 a 8.5 mm, de color negro con franjas amarillas, cabeza con pelos amarillos y algunos negros intercalados, patas color pardo-rojizo y con pelos amarillos (Figura 4) (Ayala, 1999).



Figura 4. *Melipona yucatanica*.

(Ricardo Ayala).

Morfológicamente es muy similar a *Melipona lupitae* y tiene una distribución disyuntiva a esta especie, encontrándose principalmente en Yucatán, Campeche y Quintana Roo (Ayala, 1999). *Melipona yucatanica* es una especie endémica del país (Quezada- Euán, 2005).

2.1.4 Importancia de las abejas sin aguijón y la meliponicultura en México

La meliponicultura es la cría de abejas meliponas para el aprovechamiento de miel y otros productos de la colmena como la cera. Esta práctica se realiza desde la época de Mesoamérica, antes de la introducción del género *Apis* que llegó al continente americano con el arribo de los españoles que trajeron a la abeja europea (*A. mellifera*) (Huicochea, 2011).

La religión maya estaba estrechamente ligada a la meliponicultura, habiendo un dios guardián de las abejas mayas llamado Ah Mucen Kab que era representado por una gran abeja roja (Figura 5), probablemente de la especie *Melipona beecheii*. Las abejas eran símbolo de unión entre el mundo espiritual y el terrenal, y también se vinculaban con la fertilidad (González y Quezada, 2011; Huicochea, 2011).



Figura 5. Ah Mucen Kab.

Desde esas épocas se le confería a la miel melipona propiedades curativas para el tratamiento de diversas enfermedades gastrointestinales, de vías respiratorias, oftalmológicas y para cicatrizar heridas (González y Quezada, 2011; Manzo, 2012). La miel sigue siendo apreciada y utilizada para estos fines no sólo en México, sino también en gran parte de Centroamérica, donde

se reporta su uso para tratar úlceras, heridas, conjuntivitis, cataratas, carnosidades, ojo rojo, bronquitis, sinusitis, gastritis y hemorroides, entre otras (Vit *et al.*, 2004).

Hoy en día se promueve la cría de abejas sin aguijón en diferentes lugares del país, entre ellos la Península de Yucatán, como parte del rescate de las tradiciones para la polinización de cultivos como el chile habanero y el tomate, además de la comercialización de la miel (Barceló, 2011; González y Quezada, 2011).

2.2 Miel

La única miel que está reconocida como tal es la producida por la especie *Apis mellifera*, según las normas nacionales e internacionales. Sin embargo, tanto en México como en otros países del centro y sur de América se consume miel proveniente de abejas sin aguijón. Para distinguirla de la miel de *A. mellifera* se le da diferentes nombres como “miel virgen” y “miel de castilla”. Además, la miel melipona contiene más humedad y es más ácida al gusto (Tabla 1) (Vit *et al.*, 2013).

Tabla 1.
Comparación de algunos parámetros fisicoquímicos con estándares sugeridos para mieles de abejas sin aguijón.

(Modificado de Vit *et al.*, 2004; Dardón y Enríquez, 2008; Bogdanov, 2009).

Composición de la miel	Estándares		
	<i>Melipona</i>	<i>M. beecheii</i>	<i>M. yucatanica</i>
Humedad (g/100g)	Máx. 30.0	17,32 ±2,64	20.37
Azúcares reductores (g/100g)	Mín. 50.0		
Sacarosa (g/100g)	Máx. 6.0		
Acidez (meq/100g)	Máx. 70.0	23,23 ±30,02	10,59
Cenizas (g/100g)	Máx. 0.5	0,07 ±0,05	0.06
HMF (mg/kg)	Máx. 40.0		
Actividad de Diastasa (DN)	Mín. 3.0		

2.2.1 Composición

Se han reportado alrededor de 181 sustancias diferentes en las mieles, incluyendo azúcares, proteínas, agua, vitaminas, minerales, 5-hidroximetilfurfural (HMF), enzimas, flavonoides, ácidos fenólicos y compuestos volátiles (Dluya, 2015).

2.2.2 Azúcares

Cerca del 95% del peso seco de la miel está compuesto de azúcares, principalmente fructosa, glucosa y sacarosa. Asimismo, se han detectado también otros disacáridos como maltosa, turanosa y erlosa, y trisacáridos como la meltoza y rafinosa, además de trazas de otros oligosacáridos (Bogdanov, 2009).

2.2.3 Agua

El segundo componente en cantidad de la miel es el agua. Se reporta para la miel proveniente de *A. mellifera* un promedio de humedad de 18%; mientras que para las mieles de abejas sin aguijón la humedad es de alrededor del 25%, por tanto, puede observarse una menor viscosidad. La cantidad de agua juega un papel en la susceptibilidad de la miel a fermentaciones por parte de levaduras y bacterias que están presentes de forma natural en la miel (Cauich *et al.*, 2015). El contenido de agua depende de muchos factores como el tipo de néctar, el clima y la humedad en la colmena (Bogdanov, 2009; Manyi-Loh *et al.*, 2011).

2.2.4 Vitaminas y Minerales

El contenido de minerales puede variar entre un 0.02 y 1.00 %, siendo el potasio el que aparece en mayor concentración. Se ha observado que las mieles oscuras tienen una mayor concentración de minerales a comparación de las mieles más claras. El magnesio, calcio, aluminio, hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, cobalto, cromo y fósforo, son algunos de los minerales encontrados en la miel (Bogdanov, 2009). Por otro lado, el contenido en vitaminas es bajo reportándose la presencia de ácido ascórbico (Vitamina C), riboflavina, niacina, ácido pantoténico y piridoxina (Vitaminas B₂, B₃, B₅ y B₆, respectivamente) (Profeco, 2001).

2.2.5 Ácidos

La concentración de acidez en la miel es relativamente baja, sin embargo, es importante para el sabor de la misma. El más importante de estos ácidos es el glucónico, resultado de la oxidación de la glucosa. Se han encontrado otros ácidos como el fórmico, acético, cítrico, láctico, málico, oxálico, piroglutámico y succínico (Bogdanov, 2009; Dluya, 2015).

2.2.6 Proteínas

La miel contiene enzimas, proteínas y péptidos. Aproximadamente 18 aminoácidos, esenciales y no esenciales, están presentes en la miel. La prolina está en mayor abundancia, seguida de la lisina (Bogdanov, 2009; Manyi-Loh *et al.*, 2011). Las proteínas reportadas son principalmente enzimas, como la invertasa, la diastasa, la glucosa oxidasa y la catalasa (Ulloa *et al.*, 2010).

2.3 Factores antimicrobianos de la miel

Se han reportado los efectos antimicrobianos de la miel desde la antigüedad. Los egipcios la utilizaban tanto en sus manjares como en las momificaciones, debido a que evitaba la proliferación de bacterias. Actualmente sigue usándose para aminorar los síntomas de enfermedades respiratorias y gastrointestinales como la tos y la gastritis. Aún no está del todo claro los mecanismos de acción ni los componentes específicos que contribuyen al efecto bactericida y bacteriostático de la miel; sin embargo, se sabe que existen ciertos factores como la osmolaridad, el bajo pH, el contenido de peróxido de hidrógeno y de algunos compuestos minoritarios como fenoles, flavonoides y proteínas que contribuyen a la actividad antibacteriana y antifúngica.

2.3.1 Osmolaridad

La miel tiene una concentración elevada de azúcares, alrededor del 80%, principalmente fructosa, glucosa y en menores cantidades sacarosa y maltosa, entre otros carbohidratos. Esto le confiere a la miel una alta osmolaridad, considerándose así una solución sobresaturada y un alimento con poca agua disponible para el crecimiento de microorganismos. La alta osmolaridad contribuye a disminuir la actividad bacteriana, dado que la célula intentará equilibrar la

concentración de solutos en el exterior liberando agua, lo que causa una deshidratación y posterior lisis de la membrana por implosión y muerte del microorganismo (Al-Nahari *et al.*, 2015; Dluya, 2015; Fakhri *et al.*, 2013; Mandal y Mandal, 2011).

2.3.2 Acidez y pH

Como se ha comentado con anterioridad, se han encontrado en la miel algunos ácidos que contribuyen a la acidez de la misma, de los cuales el principal es el ácido glucónico. Además, la miel funciona como un buffer, el pH no cambia con la adición de pequeñas cantidades de ácidos o bases y puede contener fosfatos, carbonatos y otras sales minerales. La mayoría de las mieles presentan un pH bajo, entre 3.3 y 5, dependiendo de factores como la floración y el tipo de abeja. El pH bajo contribuye a la actividad antimicrobiana de la miel, inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas que prefieren ambientes con pH cercanos a 7 (Bogdanov, 2009; Dluya, 2015).

2.3.3 Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno se genera por la oxidación de la glucosa de la miel por la enzima glucosa oxidasa. La glucosa oxidasa es una enzima oxidoreductasa que cataliza la oxidación de la beta-D-glucosa para la producción de D-glucono-1,5-lactona y peróxido de hidrógeno; posteriormente ocurre la hidrólisis de D-glucono-1,5-lactona dando como resultado la formación del ácido glucónico, principal responsable de la acidez en la miel (Chan, 2012). Los niveles de peróxido de hidrógeno en la miel están determinados por la diferencia entre la tasa de producción catalizada por la glucosa oxidasa (producción endógena de H₂O₂) y la degradación del compuesto en agua y oxígeno por medio de las enzimas catalasas provenientes del polen.

El peróxido de hidrógeno es un agente desinfectante común y suele utilizarse en distintas concentraciones que van desde 0.8 M hasta 8 M. Tiene actividad sobre distintas bacterias como *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Streptococcus spp.* y esporas de *Bacillus* (Bizerra *et al.*, 2012). Se ha observado que el peróxido de hidrógeno es uno de los componentes antibacterianos de la miel, que contribuye en gran medida al efecto bacteriostático y bactericida

participando en la degradación activa del DNA bacteriano por medio de la formación de radicales libres que pueden causar daño en la membrana lipídica y otros componentes celulares, evitando así el crecimiento y reproducción de las células. (Brudzynski *et al.*, 2011; Fakhri *et al.*, 2013)

El contenido de peróxido de hidrógeno en la miel es muy variable, con concentraciones que van desde 29.4 hasta 238.5 $\mu\text{mol/ mL}$ de miel (Brudzynski *et al.*, 2011). Existen incluso mieles que de manera natural no cuentan con la presencia de peróxido de hidrógeno y que presentan actividad antimicrobiana contra diversos microorganismos, tal es el caso de la miel de Manuka, lo cual indica que existen otros componentes y factores en la miel responsables de su efecto antimicrobiano (Mandal y Mandal, 2011).

2.3.4 Compuestos fenólicos, flavonoides y aromáticos

Los fenoles son compuestos que tienen grupos hidroxilos enlazados a anillos aromáticos. Los flavonoides entran en el grupo de compuestos fenólicos, siendo derivados de la fenilalanina y la malonil coenzima A (McMurry, 2001).

Se han encontrado hasta 600 compuestos volátiles en muestras de mieles (Bogdanov, 2009). Los polifenoles son un grupo de metabolitos secundarios que, aparte de proveer a las plantas el color, tiene propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes y de quelación de metales pesados tóxicos. Muchos polifenoles están relacionados con el color y sabor de alimentos de origen vegetal (Uthurry *et al.*, 2011). La miel tiene gran cantidad de flavonoides, como la apigenina, pinocembrina, quercetina, luteína, galangina, hesperetina, rutina, entre otros. Los ácidos fenólicos como el elágico, cafeico, p-cumárico, salicílico y ferúlico, también están presentes en la miel. Este tipo de compuestos fenólicos, en su conjunto, producen un efecto antioxidante y antimicrobiano (Vallianou *et al.*, 2014; Ortiz-Vázquez *et al.*, 2015). Matamoros *et al.* (2013), reportó que la miel de *Melipona beecheii* contiene los flavonoides quercetina y kaempferol, además de los compuestos naringenina y leutolina, estos últimos inducen el sistema antioxidante de la célula, previniendo enfermedades. Se ha reportado que la acción antioxidante de los flavonoides de la miel protege a las células de los radicales libres y evita la oxidación de la membrana celular (Álvarez- Suarez *et al.*, 2013).

2.3.5 Proteínas

Las proteínas de la miel constituyen alrededor del 0.1 al 0.5% de su composición. Durante el proceso de elaboración de la miel, las abejas aportan enzimas como la diastasa, que hidroliza a la maltosa. La invertasa que cataliza la conversión de sacarosa a glucosa y fructosa; la glucosa-oxidasa produce peróxido de hidrógeno y ácido glucónico a partir de glucosa en presencia de agua. Por el contrario, la catalasa inhibe a la glucosa-oxidasa y convierte el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua (Manyi- Loh *et al.*, 2011; Dluya, 2015). Se ha reportado la presencia de lisozima en la miel, que probablemente es un factor antibacteriano de la misma. Lo cual se ha correlacionado a que esta enzima rompe los enlaces β 1-4 entre N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina del peptidoglicano de la pared celular bacteriana (Ortíz-Vázquez *et al.*, 2013).

De igual forma se reporta la presencia de péptidos; algunos estudios recientes sugieren una participación activa contra microorganismos (Ortíz-Vázquez *et al.*, 2013). Estos péptidos interactúan con la membrana del microorganismo patógeno, o bien, afectan al ADN y ARN, interviniendo en diversos procesos como la replicación y la síntesis de proteínas (Rogan *et al.*, 2006). Los péptidos antimicrobianos son de naturaleza catiónica, por lo que tienen una primera interacción con las membranas bacterianas de carácter aniónico, especialmente las Gram negativas. La interacción de varios péptidos sobre la membrana celular permite la formación de canales transmembranales, lo que permite el libre flujo de iones al interior y exterior de la membrana, causando lisis celular (Hancock, 2007; Sánchez, 2016). Hay pocos estudios acerca de las proteínas y péptidos de la miel; sin embargo, se ha reportado la presencia del péptido catiónico antimicrobiano defensina-1 en la miel de abeja de Manuka, proveniente de la especie *Apis mellifera*, del cual aún se desconoce el mecanismo de acción (Kwakman *et al.*, 2011).

Se ha reportado acerca de otros péptidos antimicrobianos provenientes de la hemolinfa de abejas de la especie *Apis mellifera*, como es el caso de las apidaecinas (Ia, Ib y Ic), que tienen actividad sobre bacterias Gram negativas como *Salmonella* y *Escherichia coli* (Li *et al.*, 2006). También se reporta a la hymenoptaecina, que se caracteriza por tener un peso molecular de 10,500 Da (Casteel *et al.*, 1993); y a la abaecina que se caracteriza por ser rica en prolina. En estudios

realizados con hymenoptaecina y abaecina aislados de las especies *Bombus pascuorum* y *Bombus terrestris* se observó su capacidad para cambiar la forma de la membrana de *Escherichia coli*. Además, la hymenoptaecina produce poros que afectan la permeabilidad de la membrana, y la abaecina interactúa con la proteína chaperona DnaK de *E. coli* (Rahnamaeian *et al.*, 2015).

Por otro lado, están aquellas proteínas provenientes de la jalea real, llamadas Major Royal Jelly Proteins (MRJP), todas con pesos moleculares mayores a los 50 kDa y que tienen como característica la presencia de moléculas de manosa en su estructura, factor que contribuye a su efecto antimicrobiano. Se ha reportado que tienen actividad contra bacterias patógenas Gram negativos y Gram positivos, tales como *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* (Bucekova y Majtan, 2016; Brudzynski, 2015; Schmitzová *et al.*, 1998). Otro compuesto proteico hallado en la jalea real es la royalisina, que es una molécula catiónica de 51 aminoácidos con peso molecular entre 4 y 5 kDa que presenta actividad contra bacterias como *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Fujiwara *et al.*, 1990).

No obstante, la mayoría de los estudios realizados son con abejas del género *Apis*, aún no existen reportes de péptidos o proteínas aislados de mieles de abejas sin aguijón.

2.4 *Salmonella*

2.4.1 Clasificación

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Las bacterias de este género son bacilos Gram-negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, generalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *S. Gallinarum*). Fermentan glucosa con producción de ácido y gas (excepto *S. Typhi*). También fermentan L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, D-sorbitol, trehalosa, D-xilosa y D-dulcita. Son oxidasa negativa, catalasa positiva, indol y Voges-Proskauer (VP) negativo, rojo de metilo y citrato de Simmons positivo, urea negativa y producen SH₂ (Caffer *et al.*, 2008).

Hasta 1983, se aceptaba en la clasificación taxonómica la existencia de múltiples especies del género. Actualmente, está constituido por dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. La primera está dividida en seis subespecies: *Salmonella enterica* subespecie *enterica*, *Salmonella enterica* subespecie *salamae*, *Salmonella enterica* subespecie *arizonae*, *Salmonella enterica* subespecie *diarizonae*, *Salmonella enterica* subespecie *houtenae* y *Salmonella enterica* subespecie *indica* (Popoff y Le Minor, 1992).

Las subespecies de *Salmonella enterica* y la especie *Salmonella bongori* a su vez están divididas en más de 2500 serovariedades, que están definidas en función de diferentes asociaciones de factores antigénicos somáticos O, flagelares H o de superficie Vi (Parra M. *et al.*, 2002).

Las serovariedades o serotipos no tienen nivel taxonómico de especie por lo que sus nombres se deben escribir en letras romanas comenzando con mayúscula; así, el nombre completo de *Salmonella* Typhimurium es *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovariedad Typhimurium. Sin embargo, para fines prácticos se usa directamente *Salmonella* Typhimurium. Las serovariedades pertenecientes a subespecies distintas a la *S. enterica* y a *Salmonella bongori*, se designan con el nombre de la subespecie, seguido de la fórmula antigénica. (Caffer *et al.*, 2008)

2.4.2 Salmonelosis

La salmonelosis es una zoonosis de distribución mundial. Los grupos más afectados son lactantes, niños de corta edad, ancianos y personas con sistema inmunodeprimido.

Puede reconocerse a la salmonelosis no tífica como una gastroenteritis causada cepas distintas a *S. Typhi* y *S. Paratyphi*, causantes de la fiebre entérica (tifoidea y paratifoidea, respectivamente) que corresponde a una invasión sistémica de la bacteria en el ser humano. A diferencia de las fiebres, la salmonelosis no es exclusiva del hombre, sino que se presenta en muchos animales (Calva, 2012).

La fuente de infección más frecuente son alimentos de origen animal, principalmente carne, pollo, huevos y lácteos, y agua fresca contaminada por heces o por aguas residuales, aunque también puede encontrarse en hortalizas regadas con aguas contaminadas o fertilizadas con

abonos orgánicos de origen animal. Es considerada una Enfermedad de Transmisión Alimentaria (ETA) de relevancia internacional. A pesar de los controles implementados para evitar las infecciones por *Salmonella* debidas al consumo de alimentos contaminados, los brotes de salmonelosis continúan siendo un problema serio con millones de casos que ocurren anualmente en todo el mundo. Se estima que, en el año 2003, el costo de salmonelosis producida por alimentos contaminados ascendía a tres mil millones de dólares en Estados Unidos (Parra *et al.*, 2002).

La vigilancia y seguimiento de *Salmonella spp.* durante las cadenas de producción, almacenamiento y transporte de alimentos es un elemento importante para el control de la salmonelosis (Ovalle, 1999).

De todos los serotipos conocidos de *Salmonella*, destacan *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* como los más importantes para la salmonelosis no tifoidea transmitida desde animales a seres humanos en gran parte del mundo. Son estas mismas cepas las que producen más infecciones focalizadas en el sistema nervioso central (Dos Santos Lázaro *et al.*, 2008).

La salmonelosis tiene los síntomas característicos de una gastroenteritis febril: fiebre alta de 38-39°C, dolor abdominal, diarrea, náuseas y, ocasionalmente, vómito. Los síntomas comienzan entre las 8 y 72 horas después de la ingesta de la bacteria, y la enfermedad se mantiene entre 2 y 7 días después si se trata de enteritis y puede durar hasta tres semanas en el caso de la enterocolitis (Pascual-Anderson, 2005).

2.4.3 Infección gastrointestinal

Para la infección por *Salmonella*, se requiere un inóculo elevado, mayor a 10^6 bacterias para que se produzca la enfermedad, ya que tiene que atravesar el estómago donde hay un pH promedio de 4, dado por los jugos gástricos, que reduce significativamente el número de bacterias viables. Los microorganismos que llegan al intestino delgado deben afrontar el ambiente creado por la secreción de sales biliares y mucina para alcanzar el colón donde se enfrentarán a la microbiota normal. Influye también en la infección otros factores como el tipo de cepa bacteriana, el alimento donde se encuentra y el estado fisiológico del huésped.

Después de la ingestión y la digestión, *Salmonella* coloniza el intestino delgado y/o el colon, invadiendo las células. Para esto requiere adherirse a uno o más tipos de células del tejido intestinal, utilizando diferentes tipos de fimbrias o pili, cuatro de los cuales están definidos genéticamente como fimbria tipo 1 (*fim*), fimbria codificada por plásmidos (*pef*), fimbria polar larga (*lpf*) y fimbria agregativa delgada (Curli) (*agf/csg*) (Bäumler *et al.*, 1996).

Los estudios celulares indican que *S. enterica* puede penetrar tanto los enterocitos, como las células M que se encuentran en los nódulos linfáticos de las placas de Peyer (Tükel *et al.*, 2006). Posterior a esta interacción se produce la invasión, *Salmonella* usa una interacción bioquímica denominada Sistema de Secreción de Proteínas Tipo III (SSPIII), codificado por la Isla de patogenicidad 1 (SPI1) lo que le permite secretar e inyectar proteínas de patogenicidad en el citosol de la célula eucariota que reensamblan factores con funcionamiento en señales de transducción y son capaces de interferir en las vías de señalización de la célula huésped, lo que facilita la infección, colonización y replicación bacteriana dentro del hospedero. De esta forma, *Salmonella* utiliza las señales de transducción del hospedero para afectar el rearrreglo del citoesqueleto de actina y las proteínas superiores de membrana produciendo que las microvellosidades circundantes se degeneren con elongación, edema y crecimiento, permitiendo que la bacteria sea fagocitada por estas células que normalmente no son fagocíticas. Por el contrario, en los macrófagos produce una inhibición de la macropinocitosis, seguido por la inducción de muerte celular apoptótica, inducido por el segundo Sistema de Secreción Tipo III codificado por la Isla de patogenicidad 2 (SPI2). La actuación de este sistema en las células epiteliales permite la liberación de citoquinas CXC, como la interleucina 8 (IL8), que a su vez promueve una afluencia de polimorfonucleares neutrófilos correspondientes a la respuesta inmune inespecífica. Después de la colonización de las células epiteliales, la bacteria migra a la lámina de la región ileocecal, se multiplica en los folículos de la región linfoide produciendo hiperplasia e hipertrofia reticuloendotelial. Aquellos macrófagos que han reconocido y fagocitado a las bacterias liberan interleucina 12 (IL12) que actúa sobre los linfocitos T, activando la respuesta inmune específica. La respuesta inflamatoria produce liberación de prostaglandinas, estimula la producción de AMP cíclico y la secreción activa de líquidos, lo que da lugar a la diarrea. Para el caso de los serotipos causantes de fiebre entérica, las bacterias

migran al hígado y el vaso por la circulación sanguínea (Cárdenas-Perea *et al.*, 2006; Betancor y Yim, 2012; Calva, 2012).

2.4.4 Mecanismos de virulencia

Dentro de los factores o mecanismos de patogenicidad de *Salmonella* se encuentra el lipopolisacárido (LPS) que está compuesto por tres partes: lípido A, que tiene actividad tóxica y es conocido como endotoxina; polisacárido central, formado por distintos azúcares; cadena lateral O, con una composición altamente variable, es una cadena heteropolisacárida que constituye el antígeno O. Cuenta además con los flagelos, que le permiten la movilidad hasta la zona intestinal, ayudan para atravesar la capa de mucina presente y favorecen el proceso inflamatorio. Las fimbrias que se mencionaron con anterioridad, también son mecanismos de virulencia. Para *S. Typhimurium* se han descritos 13 operones cromosómicos implicados en la formación de fimbrias, sin embargo, no todas ellas están asociadas con la virulencia ya que existen cepas no patógenas que pueden contener uno o más tipos de fimbrias (White *et al.*, 2003). La cápsula es otro de los mecanismos de virulencia, sin embargo, es específico para el serotipo Typhi.

Por otro lado, se encuentran los genes de patogenicidad, para *Salmonella* pueden mencionarse las islas de patogenicidad, que codifican para factores específicos de virulencia como es el caso de los sistemas de secreción de proteínas que le ayudan a la célula bacteriana a cambiar la conformación de la célula eucariótica, permitiendo el ingreso y la permanencia de *Salmonella* en el huésped. También están aquellos genes para la resistencia a antibióticos (Betancor y Yim, 2012; Calva, 2012).

2.4.5 Resistencia a antibióticos

Al igual que otras bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, los diferentes serovares de *Salmonella* también han presentado resistencia antibióticos. Para el caso de *Salmonella Typhimurium*, algunas cepas han desarrollado multirresistencia a tratamientos antibióticos, específicamente a cinco agentes: ampicilina, cloranfenicol, estreptomina,

sulfonamidas y tetraciclina. Se han encontrado también cepas resistentes a quinolonas como son el ciprofloxacino y el levofloxacino (Glynn *et al.*, 1998; Molbak *et al.*, 1999; Zaidi *et al.*, 2006).

Entre los mecanismos de resistencia que utiliza *Salmonella sp.* podemos encontrar la producción de enzimas que inactivan a las moléculas que tienen efectos bacteriostáticos y bactericidas. Las betalactamasas son capaces de hidrolizar antibióticos betalactámicos, que son aquellos que forman parte del grupo de las penicilinas como, por ejemplo, ampicilina, amoxicilina, oxacilina, metilcilina, entre otros. Estos antibióticos inhiben la síntesis de peptidoglicano, afectando la integridad de la pared celular bacteriana (Suárez y Gudiol, 2009).

Los aminoglucósidos son un grupo de moléculas que actúan a nivel ribosomal, inhibiendo la síntesis de proteínas y produciendo una lectura errónea de la información del ARN mensajero, determinando la incorporación de algunos aminoácidos incorrectos en la cadena peptídica. La resistencia antibacteriana puede darse por diversos mecanismos, entre ellos la inactivación de los compuestos por enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMA). Estas enzimas catalizan la modificación covalente de grupos aminos e hidroxilos de la molécula, generando modificaciones químicas que llevan al aminoglucósido a unirse débilmente a los ribosomas bacterianos. La estreptomomicina y la gentamicina son ejemplos de este grupo a los que ha presentado resistencia *Salmonella sp.* (Mella *et al.*, 2009). También se ha reportado la presencia de cloranfenicol acetil transferasas, que inhiben los antibióticos pertenecientes al grupo de los fenicoles (Gallardo *et al.*, 1999).

Otro grupo de moléculas son las tetraciclinas, antibióticos bacteriostáticos de amplio espectro, que requieren penetrar a la célula de la bacteria gramnegativa por mecanismos de difusión pasiva a través de los canales hidrófilos (porinas) y por procesos de transporte activo dependiente de energía. Una vez dentro de la célula, estas moléculas se unen de manera reversible a los receptores en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano y de esta manera se bloquea la fijación del aminoacil-tRNA al sitio aceptor del complejo mRNA-ribosoma, evitando la incorporación de nucleótidos, inhibiendo la síntesis proteica (Mendoza y Campos, 2009). Se han estudiado los posibles mecanismos de resistencia, siendo el principal, una bomba de eflujo específica para tetraciclinas, codificada por los genes *tetA* y *tetG*, que han sido hallados en cepas de *Salmonella*

Typhimurium, así como también la protección del ribosoma por medio de proteínas, que aparentemente también se presenta en esta bacteria (Mosquito *et al.*, 2011; Chopra, 2001).

Las quinolonas y fluoroquinolonas (levofloxacino, ciprofloxacino, etc.) son antibióticos de tipo bactericida de amplio espectro, que tienen como mecanismo la inhibición de la acción de las topoisomerasas tipo II (ADN girasa y topoisomerasa IV). En bacterias Gram-negativas la ADN girasa, es el blanco principal mientras que la topoisomerasa IV actúa como diana secundaria (Mosquito *et al.*, 2011). Su uso extensivo, tanto en animales como humanos, ha resultado en bacterias que desarrollan rápidamente resistencia a estos agentes, siendo la resistencia a las quinolonas sumamente indeseable dado que estos compuestos son altamente eficaces para el tratamiento de un amplio rango de enfermedades graves producidas por bacterias multirresistentes en humanos (Orden y De la Fuente, 2001). Entre los mecanismos moleculares de resistencia a estos antibióticos se encuentran las alteraciones en los blancos de quinolonas por mutaciones puntuales, las bombas de expulsión activa y la transferencia de genes de resistencia plasmídicos que codifican para proteínas que se unen a la ADN girasa y a la topoisomerasa IV, disminuyendo la acción de las quinolonas (Mosquito *et al.*, 2011; Ruiz, 2003; Hooper Y Wolfson, 1989).

Capítulo 3. Justificación

Salmonella Typhimurium es uno de los principales serotipos causantes de salmonelosis (enfermedad gastrointestinal) en seres humanos a nivel mundial. La falta de un diagnóstico adecuado aunado al uso indiscriminado y excesivo de antibióticos ha producido una creciente resistencia a éstos por parte de distintas bacterias patógenas, entre ellas *S. Typhimurium*, de la que se han encontrado cepas multirresistentes a más de diez antibióticos. Por tales motivos, es necesario la búsqueda de nuevos compuestos para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos. Una alternativa son los compuestos naturales tales como las mieles de abejas sin aguijón, usadas desde la antigüedad como remedio para diversas enfermedades. Recientemente se ha reportado que la miel de *Melipona* posee actividad bactericida contra patógenos causantes de trastornos gastrointestinales. Con base en lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo determinar la actividad antibacteriana de mieles de *Melipona* (*M. beecheii* y *M. yucatanica*) contra *Salmonella* Typhimurium, de igual manera caracterizar los componentes proteicos presentes en ambas mieles y elucidar la contribución de estas proteínas en la actividad antimicrobiana de las mieles de *Melipona* (*M. beecheii* y *M. yucatanica*).

Capítulo 4. Hipótesis

Las mieles provenientes de las especies *Melipona beecheii* y *Melipona yucatanica*, así como sus correspondientes extractos proteicos, poseen actividad antibacteriana contra *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311. Las proteínas contribuyen como factor antibacteriano a la actividad antimicrobiana de la miel.

Capítulo 5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antibacteriano de dos mieles de *Melipona* (*M. beecheii* y *M. yucatanica*) y de los componentes proteicos extraídos de las mismas, sobre el crecimiento y la inhibición de *Salmonella* Typhimurium.

5.2 Objetivos particulares

1. Determinar cualitativamente la sensibilidad de *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 a las mieles de *Melipona* y a sus extractos proteicos.
2. Evaluar el efecto antibacteriano de las mieles de *Melipona* y a sus extractos proteicos sobre *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, determinando las Concentraciones Mínimas Inhibitorias.
3. Evaluar el efecto bactericida y bacteriostático de las mieles de *Melipona* y sus extractos proteicos en la inhibición de *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311.

Capítulo 6. Materiales y métodos

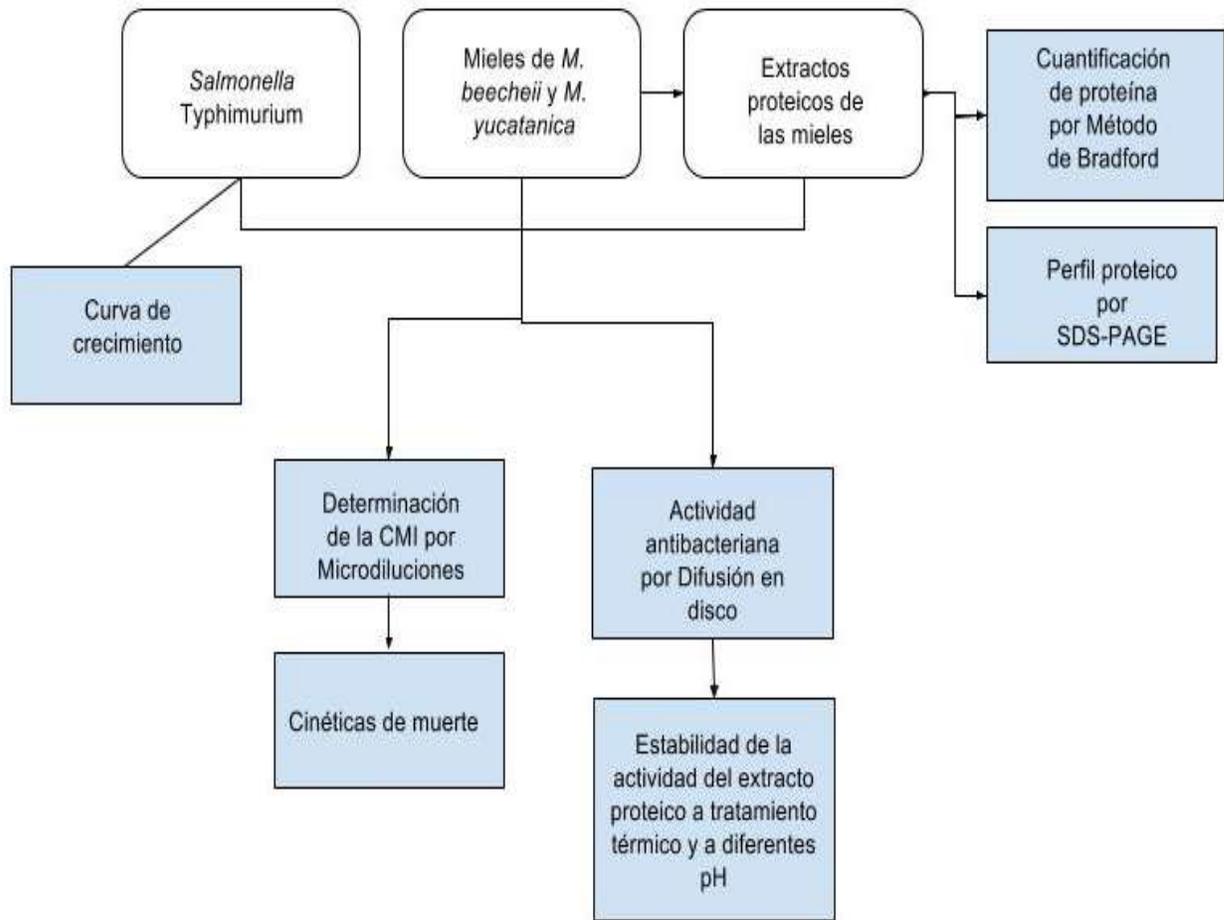


Figura 6. Diagrama de la metodología

6.1 Materiales biológicos

La miel de *Melipona beecheii* que se usó en este trabajo proviene de Maní, Yucatán; así mismo, la miel de *Melipona yucatanica* de José María Morelos, Quintana Roo. Éstas fueron recolectadas de manera tradicional, es decir, tomadas directamente del jobón (tronco hueco), de tal forma que no tuviese ningún contacto químico o proceso que pudieran afectar sus cualidades y propiedades originales. La miel fue guardada a temperatura ambiente y en obscuridad hasta su análisis. La cepa utilizada para las pruebas fue *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC13311.

6.2 Curva de crecimiento

Para determinar la curva de crecimiento de *Salmonella* Typhimurium ATCC13311, se preparó un inóculo de 1.0 en la escala McFarland, equivalente a 10^8 bacterias, a partir de un cultivo de 8-9 horas de incubación de *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311. Se utilizaron matraces con 50 mL de medio líquido LB, y se añadió un inóculo de 50 μ L para obtener una concentración final de 10^6 bacterias/mL. La prueba se hizo por triplicado, además de un blanco y un testigo. Todos los matraces se taparon con tapones de algodón para permitir un ambiente aerofílico estéril. Se incubaron a 37°C con agitación y se tomaron lecturas de la absorbancia a 600nm cada 60 minutos hasta que los valores fueran constantes.

6.3 Extracción de los compuestos proteicos de las mieles de *Melipona*

Para la extracción de las proteínas presentes en la miel se empleó el método descrito por Schmitzova' *et al*, 1998, el cual consistió en diluir 1 gr de la miel de melipona en 10 ml de buffer de fosfatos (50 mM NaH_2PO_4 : Na_2HPO_4 , pH 7.0; 100 mM NaCl, pH 8.0). La mezcla se incubó en hielo por 30 minutos, con intervalos de agitación de 5 minutos. Posterior a la agitación la mezcla fue centrifugada a 5000 rpm por 30 min para eliminar polen y diversas partículas presentes en la miel. El sobrenadante fue concentrado mediante ultrafiltración, utilizando minicolumnas Amicon de 3 kDa centrifugados a 5000 rpm por 40 min. Una vez centrifugadas las muestras el concentrado fue traspasado a tubos falcon de 15 mL y guardados a 4°C hasta su posterior análisis.

6.4 Determinación de la concentración proteica en las mieles de *Melipona*

El contenido proteico se determinó por el método de Bradford. Para reportar dicho contenido se hizo una curva estándar de BSA (albumina sérica bovina) de la marca Sigma con concentraciones de 1,2.5, 5, 10, 15, 20 μ g/ μ l. Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595nm. En el caso de las muestras se tomó 1 μ l del extracto, se añadieron 99 μ l de H_2O destilada y 1ml de la solución de Bradford. Las muestras se incubaron por 10 min a temperatura ambiente y al finalizar el tiempo, fueron leídas en un espectrofotómetro (Bradford, 1976). La cuantificación se realizó por triplicado.

6.5 Determinación del perfil proteico por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)

Para determinar el perfil proteico del extracto, se hizo una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) con un sistema discontinuo (Bizani *et al.*, 2005). Se utilizaron dos tipos de geles, un gel de separación de acrilamida al 12% y uno de apilamiento de acrilamida al 4%, con un buffer de corrida (Glicina-Tris-SDS). Para la preparación de la muestra se tomaron entre 1 y 3 μL de extracto, dependiendo de la concentración de la muestra (máximo $6\mu\text{g}/\mu\text{L}$, los cuales fueron diluidos en 3 μL de buffer de carga (5x) y aforados con agua destilada a un volumen de 15 μL ; posteriormente las muestras se incubaron por 5 min a 95 °C para favorecer la desnaturización de las proteínas. Los geles se corrieron a 80 V durante 2 horas a temperatura ambiente y teñidos con nitrato de plata.

6.6 Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar

Se preparó un inóculo de 1.0 en la escala McFarland, equivalente a 10^8 bacterias, a partir de un cultivo de 8-9 horas de incubación de *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311. Se diluyó con solución salina 1:100 para obtener una concentración de 10^6 bacterias. Se hizo una siembra masiva con hisopo estéril en cajas Petri con agar Müller Hinton. Posteriormente se colocaron discos de papel filtro estériles de la marca Millipore y sobre los discos se añadió el extracto proteico a diferentes cantidades de 200, 300, 400 y 500 μg de proteína total y la miel al 10, 20, 40 y 80 %. Todas las cajas fueron incubadas a 37°C. Se midieron los halos de inhibición a las 12, 24, 48 y 72 horas de incubación. Se utilizó como control positivo ampicilina a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (20 μg), y como control negativo agua destilada estéril o buffer de fosfatos estéril para el caso del extracto proteico.

6.7 Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria por el método de microdiluciones

Se evaluaron concentraciones desde 50 hasta 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los extractos proteicos y concentraciones desde 5% hasta 50% de las mieles de *Melipona*. Se utilizaron tubos eppendorf de 2 ml, con 125 μl de medio caldo Müller Hinton a cuádruple concentración (4X), la cantidad correspondiente del extracto a evaluar, 50 μl de inóculo ajustado a 10^7 de *Salmonella*

Typhimurium ATCC 13311 y llevado a un volumen final de 500 µl con agua destilada estéril. Cada concentración se hizo por triplicado, más un blanco por cada concentración probada hecho con solución salina estéril en lugar del inóculo. Como control positivo se utilizó ampicilina y como control negativo agua destilada estéril para la miel y buffer de fosfatos estéril para el extracto proteico. Los tubos fueron incubados a 37° C durante 24 horas. Se leyó la absorbancia a 600 nm con un espectrofotómetro (Schwalbe *et al.*, 2007).

6.8 Curvas de efecto antibacteriano por absorbancia

Se evaluaron las mieles a 0.5x, 1x, y 2x de la concentración mínima inhibitoria. Se utilizaron tubos eppendorf de 2 ml, con 125 µl de medio caldo Müller Hinton a cuádruple concentración (4X), la cantidad correspondiente del extracto a evaluar, 50 µl de inóculo (ajustado a 1 de absorbancia a 600nm) de *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 y llevado a un volumen final de 500 µl con agua destilada estéril. Como control positivo se utilizó ampicilina y como control negativo agua destilada estéril para la miel. Los tubos fueron incubados a 37°C. Se leyó la absorbancia a 600 nm con un espectrofotómetro cada hora desde el tiempo 0 hasta la hora 6 y posteriormente las horas 12 y 24, cada tiempo por triplicado (Schwalbe *et al.*, 2007).

6.9 Evaluación del efecto del pH y la temperatura en la actividad antibacteriana de los extractos proteicos

Para evaluar el efecto de la temperatura, los extractos proteicos fueron sometidos a un tratamiento térmico a 95°C durante 10 minutos y se probaron con cantidades de 500 µg de proteína total en ensayo de difusión en disco en agar Müller Hinton. Para evaluar el efecto del pH, se utilizaron extractos obtenidos con buffer de fosfatos a pH 5.7, 7 y 8, probando cantidades de 500 µg de proteína total por difusión en disco. Todas las cajas fueron incubadas a 37°C. Se midieron los halos de inhibición una sola vez después de 12 horas de incubación en el caso de la prueba para pH y a las 18 horas para el tratamiento térmico. Se utilizó como control positivo ampicilina a una concentración de 1 µg/ µL (20 µg), y como control negativo buffer de fosfatos estéril.

Capítulo 7. Resultados y discusión.

7.1 Curva de crecimiento de *Salmonella Typhimurium*

En la Figura 7 se muestra la curva de crecimiento para *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311.

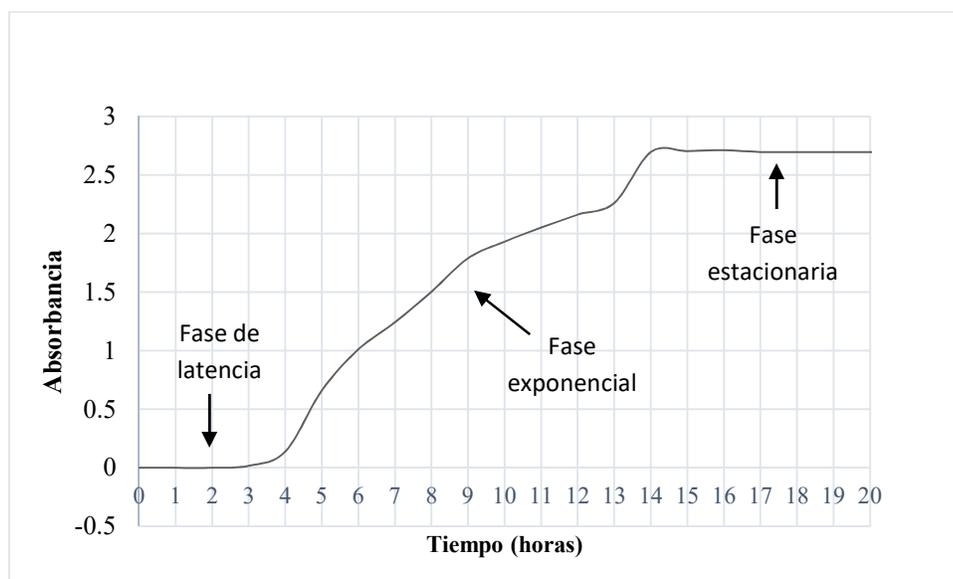


Figura 7. Curva de crecimiento de *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar *Typhimurium* ATCC13311.

Pueden distinguirse claramente tres fases, la fase de latencia que abarca desde la hora cero hasta la hora 4 y que es la etapa de adaptación de la bacteria al medio en el que ha sido inoculada, previa a la etapa de reproducción. La segunda fase, llamada logarítmica o exponencial, comienza en la hora 5 y se extiende hasta la hora 13. A partir de la hora 14 y hasta la hora 24, la curva se mantuvo constante por lo que puede reconocerse la fase estacionaria.

Se decidió utilizar la hora 8 para realizar los experimentos de actividad antimicrobiana debido a que en esta hora la bacteria se encuentra a la mitad de la fase exponencial, hay más células vivas que muertas y están en condiciones para seguir replicándose.

7.2 Extracción de proteínas, cuantificación y perfil proteico

La extracción se hizo bajo las condiciones indicadas en el método. La cuantificación se realizó utilizando el método de Bradford, haciendo una curva estándar con albúmina sérica bovina que se muestra en la Figura 8.

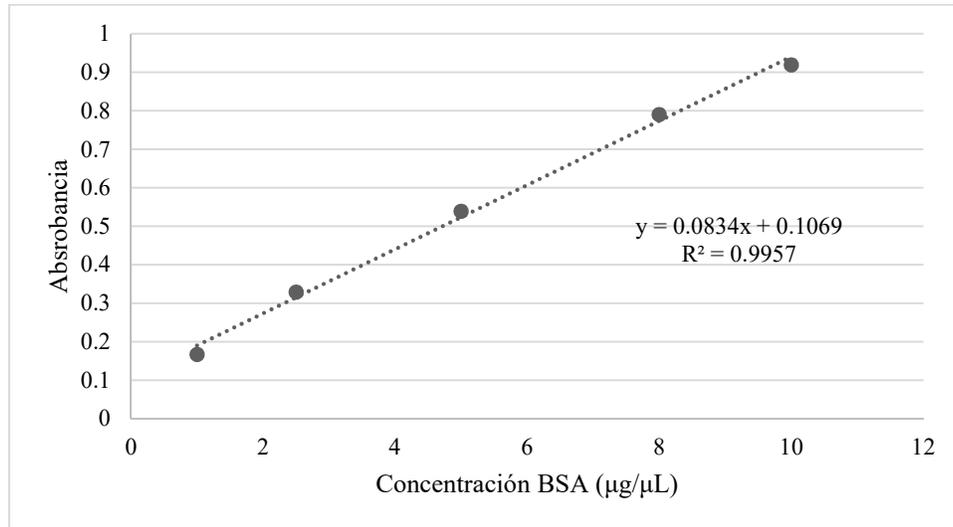


Figura 8. Curva estándar de albúmina sérica bovina para el método de cuantificación de Bradford.

Se obtuvo una concentración promedio de 86.93 ± 7.86 mg de proteínas por 100 g de miel, para la miel de *M. beecheii*, y una concentración de 75.35 ± 16.53 mg/100 g de miel para *M. yucatanica* que corresponden al 0.087 % y al 0.075% de la composición de la miel, respectivamente. Mendieta (2002) ha reportado la cantidad de proteína en mieles provenientes de diferentes especies que van desde 8 mg hasta 55 mg por cada 100 g de miel, con una alta variabilidad según la especie de abeja y la floración de la miel.

Por otro lado, se obtuvieron los perfiles electroforéticos de los extractos proteicos de las mieles mostrados en las figuras 6 (*M. beecheii*) y 7 (*M. yucatanica*), y se calcularon los pesos moleculares de las bandas mostrados en la tabla 2. Tanto el número de bandas como los pesos moleculares de las mismas resultaron diferentes para cada extracto, esto significa que tienen un perfil proteico particular. A pesar de que algunas bandas pueden mostrar pesos moleculares

similares o iguales como sería el caso de las bandas número 5 de ambos extractos que presentan un peso de 40 kDa en el caso de *M. beecheii* y de 42 kDa para *M. yucatanica*, no puede asegurarse que se trate de las mismas proteínas, se requerirían más estudios para la identificación de éstas.

Las siete bandas que presentó la muestra de miel de *M. beecheii* (Figura 9) se observan íntegras, además de ser comparables con el perfil de miel y hemolinfa proveniente de miel de abeja de *Melipona beecheii* reportados con anterioridad (Ramón Sierra, 2015). Para el caso de la muestra de miel de *M. yucatanica*, como se muestra en la Figura 10, se observan 6 bandas nítidas, con diferentes pesos moleculares que van de los 18 a los 107 kDa, es importante resaltar que este es el primer reporte que se hace sobre el perfil proteico de la miel de esta especie. Los pesos moleculares de todas las bandas observadas son altos en comparación a los reportados para péptidos, que generalmente presentan pesos moleculares por debajo de 10 kDa. Sin embargo, como ya se ha mencionado, en la miel se han encontrado otras proteínas, como diferentes tipos de enzimas, por ejemplo, proteasas, o proteínas productos de las Major Royal Jelly Proteins (MRJP) que podrían estar presentes en las muestras.

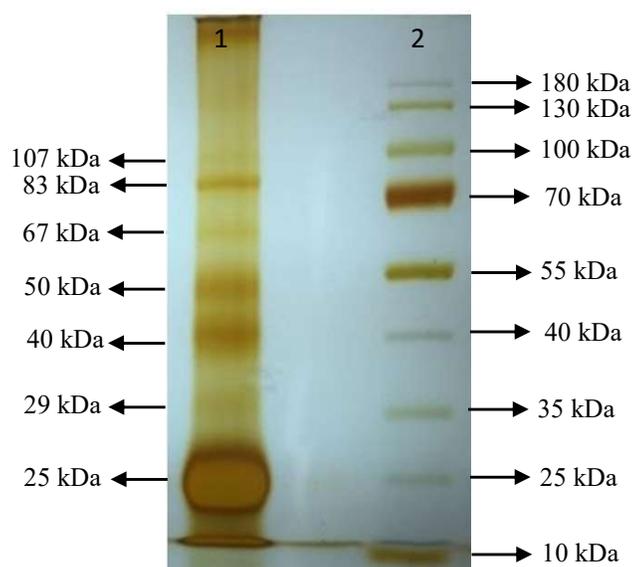


Figura 9. Perfil proteico del extracto de proteínas de la miel de *Melipona beecheii*.

1) muestra, 2) marcador de peso molecular

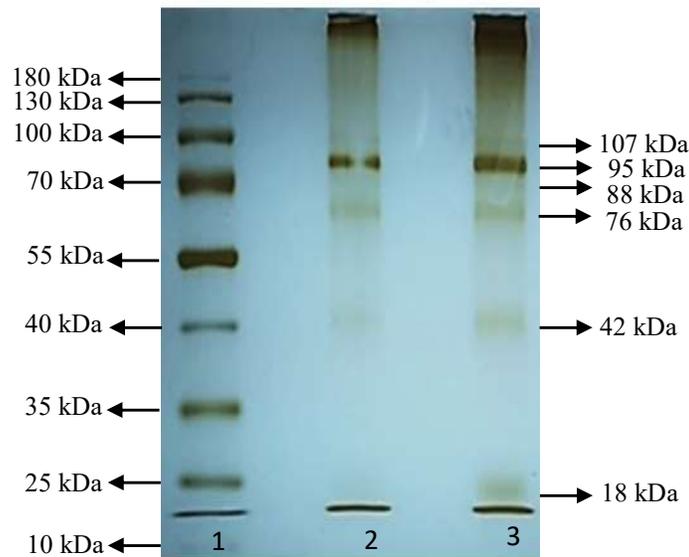


Figura 10. Perfil proteico del extracto de proteínas de la miel de *Melipona yucatanica*.

1) marcador de peso molecular, 2) 2 µg de muestra, 3) 4 µg de muestra.

Los métodos electroforéticos son de gran utilidad para la detección, cuantificación e identificación de proteínas. El perfil electroforético permite obtener una serie de bandas cuyo número y posición constituyen una huella dactilar característica (López y Vanecia, 1999). Ramón Sierra (2015) señala que las proteínas presentes en la miel mantienen una directa relación con la abeja de la que proviene, por lo que el perfil proteico presentará el mismo número y tamaño de proteínas en mieles provenientes de abejas de la misma especie y serán diferentes cuando provengan de especies distintas. En el mismo estudio de Ramón Sierra (2015) se usó el perfil electroforético como un marcador biológico en la miel para identificar el origen entomológico, distinguiendo entre diferentes géneros de abejas (*Apis*, *Melipona* y *Trigona*). Este es el primer reporte que se hace del perfil electroforético del extracto crudo proteico de la miel de *Melipona yucatanica*, siendo relevante porque confirma lo mencionado con anterioridad, donde el perfil proteico puede utilizarse para distinguir el origen de la miel incluso a nivel especie, distinguiendo en este caso entre dos especies del mismo género *Melipona* (Figura 11).

Tabla 2.
Pesos moleculares (kDa) de las bandas de los extractos proteicos.

No. Banda	1	2	3	4	5	6	7
<i>M. beecheii</i>	107	83	67	50	40	29	25
<i>M. yucatanica</i>	107	95	88	76	42	18	

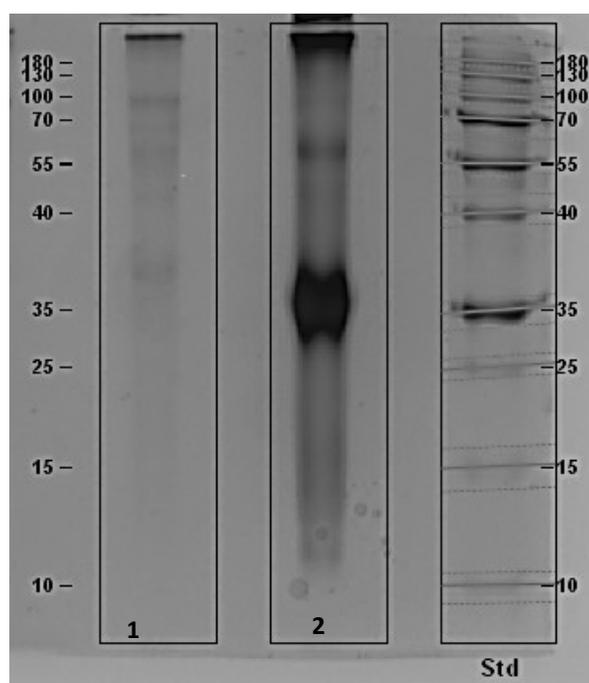


Figura 11. Comparativo de los perfiles electroforéticos de los extractos proteicos de las mieles de *M. yucatanica* y *M. beecheii*.

1) *M. yucatanica*, 2) *M. beecheii*, Std) Marcador de peso molecular

7.3 Actividad antibacteriana. Método de difusión en agar con disco

S. Typhimurium mostró sensibilidad a la miel de *M. beecheii* observándose la aparición de halos de inhibición alrededor de los discos de difusión correspondientes a las concentraciones de 40 y 80% (v/v) después de 24 horas de incubación (Figura 12). Después de 48 horas, sólo la concentración de miel al 80% siguió mostrando inhibición, con un halo de menor diámetro a

comparación del mismo a las 24 horas, lo que indica una posible actividad bacteriostática. La disminución del diámetro de los halos con respecto al tiempo se muestra en la Figura 13. *Salmonella* Typhimurium no mostró inhibición ante la presencia de la miel de *M. yucatanica* (Figura 14), sin embargo, se observó una disminución en el crecimiento de colonias alrededor de los discos de difusión de miel al 40 y 80 % (v/v).



Figura 12. Difusión en agar de miel de *M. becheii*.

a) 10%, b) 20%, c) 40%, d) 80% (v/v), e) agua destilada estéril, f) ampicilina 20µg).

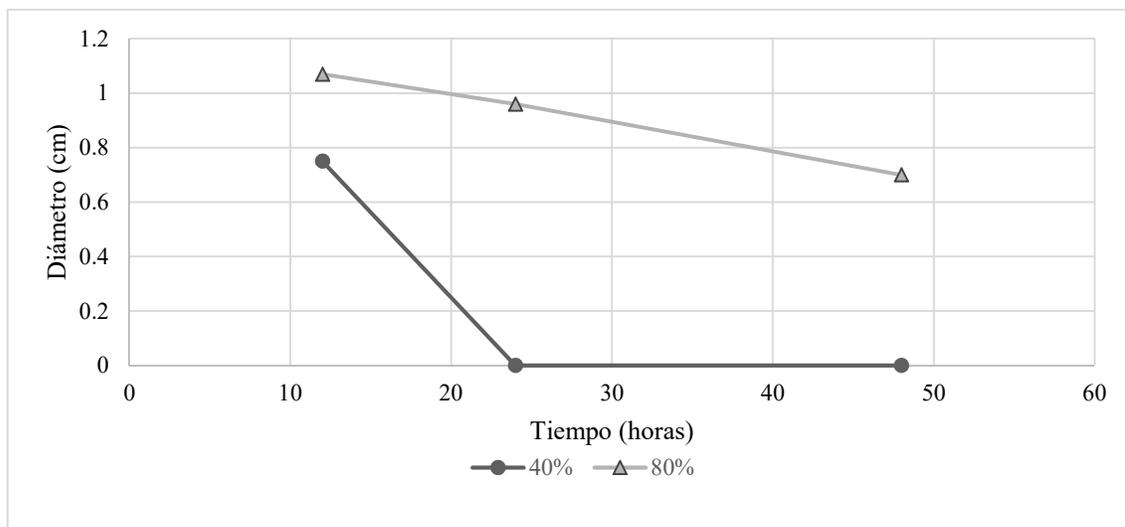


Figura 13. Disminución del diámetro de los halos de inhibición de la miel de *M. beecheii* con respecto al tiempo a diferentes concentraciones % (v/v).

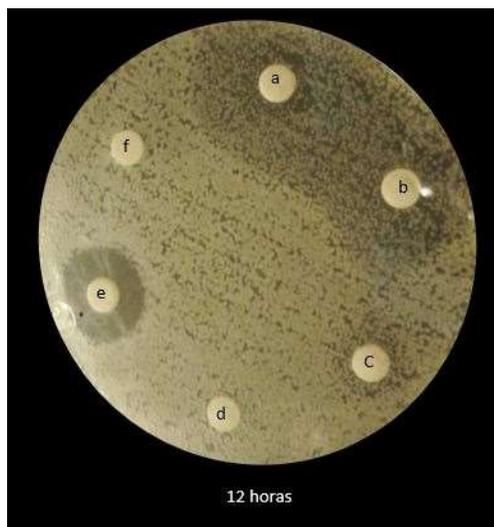


Figura 14. Difusión en agar de miel de *M. yucatanica*.

a) 80%, b) 40%, c) 20%, d) 10% (v/v), e) ampicilina (20µg) y f) agua destilada estéril.

En estudios anteriores se ha demostrado la sensibilidad de diferentes serotipos de *Salmonella enterica* ante mieles provenientes de diferentes especies de abejas, como el realizado por Boorn

et al. en 2010, donde la cepa ATCC 13311 fue inhibida por mieles de *Trigona carbonaria* a concentraciones del 50, 75 y 100% (p/v).

Cabe resaltar que ambas mieles redujeron el crecimiento bacteriano, sin embargo, sólo la miel de *M. beecheii* mostró una inhibición definida. En contraste con lo observado para los extractos proteicos, donde el extracto proteico de *M. yucatanica* mostró halos de inhibición definida de mayor diámetro y con una mayor duración que el extracto de *M. beecheii* (Figura 15), la miel de *M. beecheii* resultó con una inhibición bien definida debido probablemente al conjunto de otros componentes además del proteico, como podrían ser ácidos fenólicos y flavonoides (a quienes también se les ha atribuido parte del potencial antibacteriano y antioxidante de las mieles), el pH, el contenido de peróxido de hidrógeno, entre otros compuestos que pueden estar trabajando en forma sinérgica con las proteínas (Viuda-Martos *et al.*, 2008). Diversos autores le atribuyen el potencial antimicrobiano de la miel al peróxido de hidrógeno, reportando que con concentraciones de 3.6 a 9.9 mg de H₂O₂ / 100 g de miel es suficiente para inhibir diversas bacterias. Debe aclararse que estos estudios son en mieles de *Apis mellifera*, por lo que no se tienen reportes del contenido de peróxido de hidrógeno en mieles *M. beecheii*. En el presente trabajo se determinó que la miel de *M. beecheii* tiene una concentración de 3.05 mg de H₂O₂ / 100 g de miel, cantidad que está cercana a lo reportado en otros tipos de mieles que presentan actividad antimicrobiana. En la contraparte, la miel de *M. yucatanica* no mostró halos de inhibición definidos. Esto puede deberse a distintos factores, como que el contenido de H₂O₂ es 4 veces menor que el de la miel de *M. beecheii*, (0.768 mg de H₂O₂ / 100 g de miel), además que el contenido proteico de la miel de *M. yucatanica* es del 0.075% de la composición el cual es menor a comparación de la miel de *M. beecheii*.

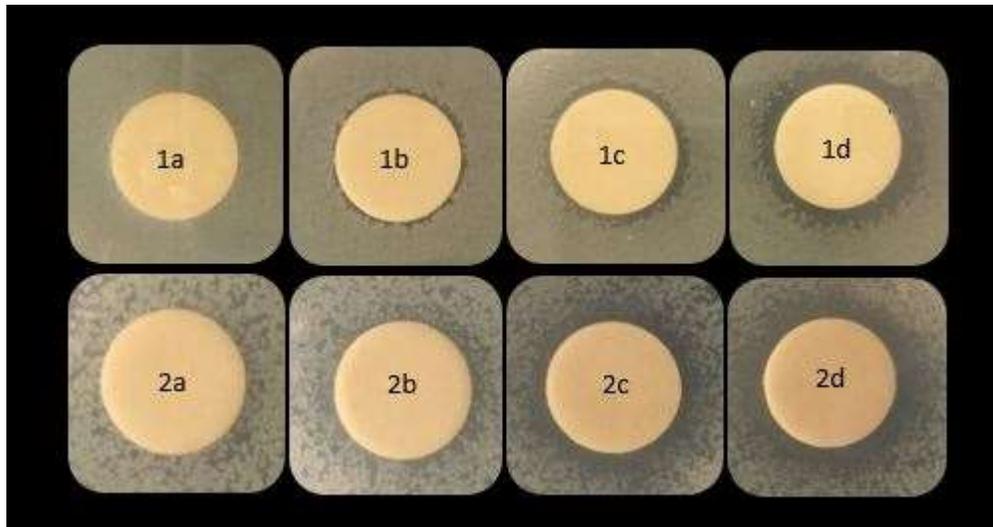


Figura 15. Difusión en agar de los extractos proteicos.

Extracto proteico de la miel de *M. beecheii* (1) y *M. yucatanica* (2) a concentraciones de a) 200µg, b) 300µg, c) 400µg y d) 500µg de proteína total. A las 24 horas de incubación.

Para el caso de los extractos proteicos de las mieles, *S. Typhimurium* mostró sensibilidad tanto para el proveniente de la miel de *M. beecheii* como para el de la miel de *M. yucatanica*. Ambos extractos se probaron a concentraciones de 300, 400 y 500 µg de proteína total (Figura 15). El extracto de miel de *M. yucatanica* resultó inhibir a la bacteria durante un período de 48 horas a una concentración de 500 µg, como se observa en la Figura 16, mientras que el extracto de miel de *M. beecheii* a esa misma concentración sólo mantuvo su actividad durante 36 horas, tal como se observa en la Figura 17.

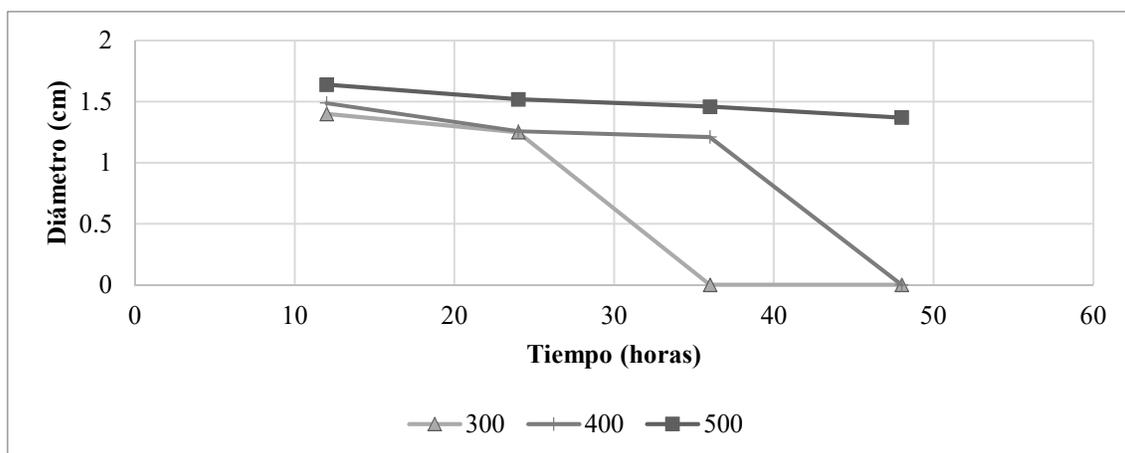


Figura 16. Disminución del diámetro de los halos de inhibición del extracto proteico de la miel de *M. yucatanica* con diferentes cantidades de proteína total (µg).

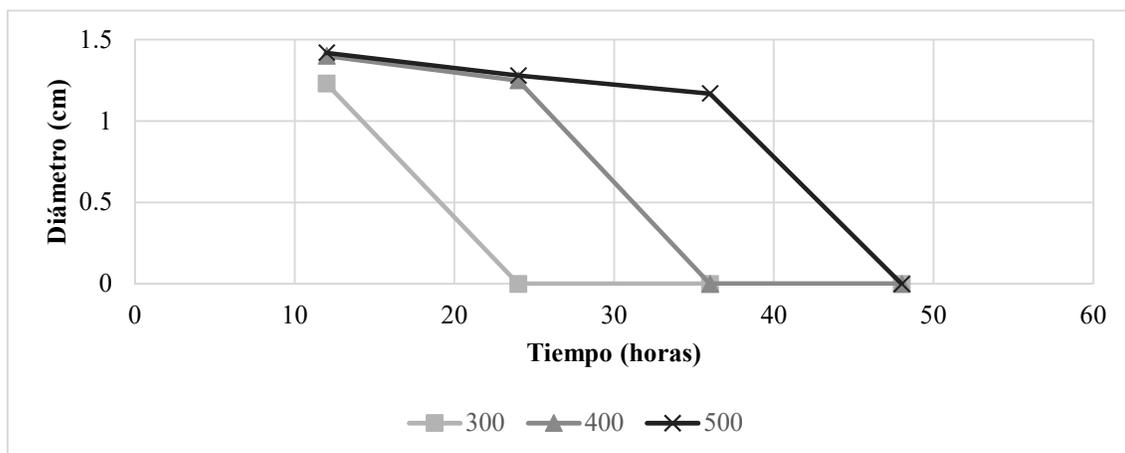


Figura 17. Disminución del diámetro de los halos de inhibición del extracto proteico de la miel de *M. beecheii* con diferentes cantidades de proteína (µg).

En contraste con lo observado con las mieles, donde la miel de *M. yucatanica* no mostró halos de inhibición definida, el extracto proteico de la miel de *M. yucatanica* mostró halos de inhibición definida de mayor diámetro y con una mayor duración que el extracto proteico de la miel de *M. beecheii*. Este efecto podría deberse a que algún componente de la miel afecte o interactúe con las proteínas de *M. yucatanica*, disminuyendo así la posibilidad de interacción con la bacteria y por ende la capacidad antibacteriana. Se tiene reportes que moléculas de estructura fenólica como el caso de los taninos, pueden formar complejos estables con las

proteínas promoviendo su precipitación e impidiendo que mantengan sus propiedades, así como su digestibilidad (Morales y Troncoso, 2012).

Por otro lado, las proteínas y péptidos aislados de las abejas, la jalea real y la miel como, por ejemplo, la apidaecina, la abaecina y la hymenoptaecina, han demostrado tener actividad antibacteriana, (Huizar *et al.*, 2004). Sin embargo, sólo el péptido defensina-1, ha sido aislado de mieles de Manuka (Kwakman *et al.*, 2011; Bucekova *et al.*, 2017). Con los resultados obtenidos, se puede sugerir la posibilidad de que los extractos proteicos de las mieles contengan tanto proteínas como péptidos con actividad antibacteriana, entre los cuales podrían encontrarse algunos de los descritos con anterioridad.

Tomando en cuenta que no existen reportes sobre el potencial antibacteriano de miles de *M. beecheii* y *M. yucatanica* este es el primer reporte sobre el potencial antimicrobiano de mieles de Melipona y sus extractos proteicos contra *S. Typhimurium*.

7.4 Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad de los extractos proteicos

El extracto de *M. beecheii* perdió por completo su actividad antibacteriana contra *S. Typhimurium* después del tratamiento térmico. No así el extracto de *M. yucatanica*, el cuál mostró halos de inhibición definida después del tratamiento térmico (Figura 18). De igual forma, los extractos proteicos obtenidos a diferente pH (5.7, 7 y 8) de *M. yucatanica* presentaron actividad antibacteriana (Figura 19). En la Figura 20, se observa que los extractos proteicos de la miel de *M. beecheii* con pH ácido de 5.7 y pH básico de 8 no mostraron halos de inhibición contra *Salmonella Typhimurium*, únicamente mostró actividad a pH 7.

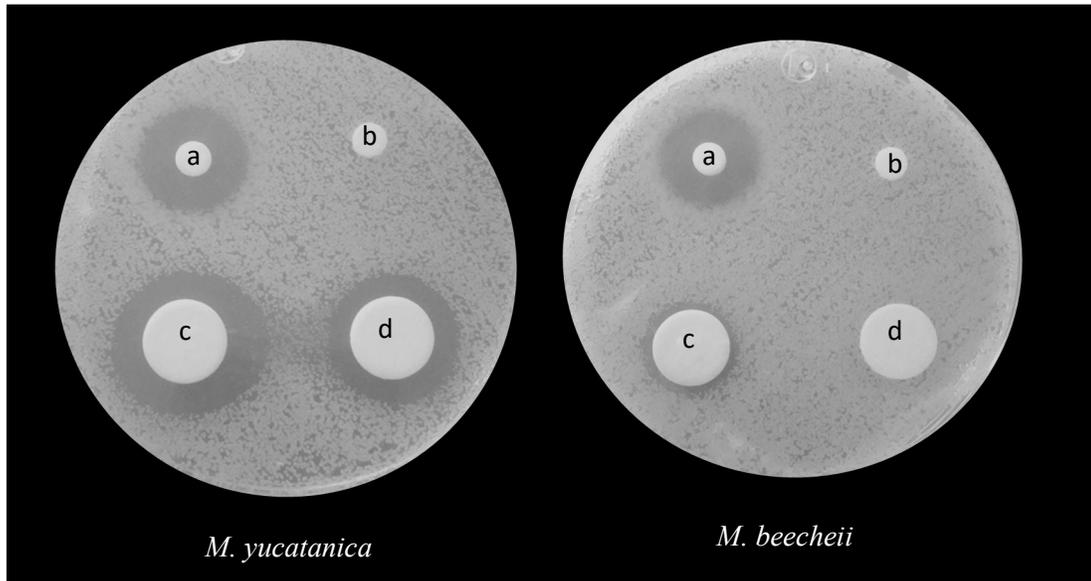


Figura 18. Efecto de la temperatura en la actividad antibacteriana de los extractos proteicos de las mieles.

a) ampicilina (20µg), b) buffer de fosfatos, c) extracto proteico de la miel sin tratamiento térmico, d) extracto proteico de la miel después de tratamiento térmico

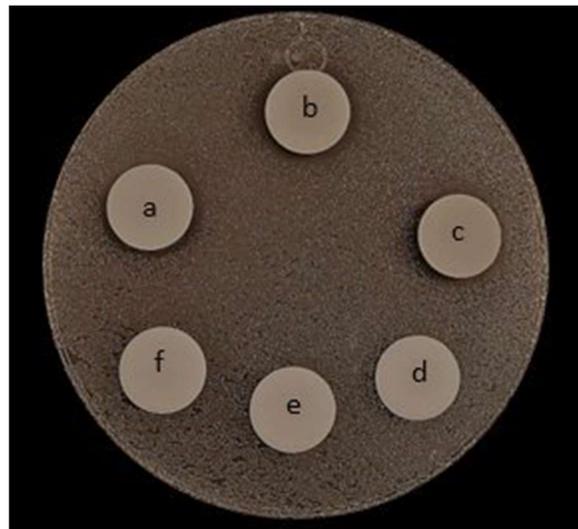


Figura 19. Difusión en disco de extractos proteicos de *M. yucatanica* (EPMY) a diferentes condiciones de pH contra *Salmonella Typhimurium*.

a) EPMY pH 5.7, b) EPMY pH 7, c) EPMY pH 8, d) Buffer de fosfatos pH 8, e) Buffer de fosfatos pH 7, f) Buffer de fosfatos pH 5.7.

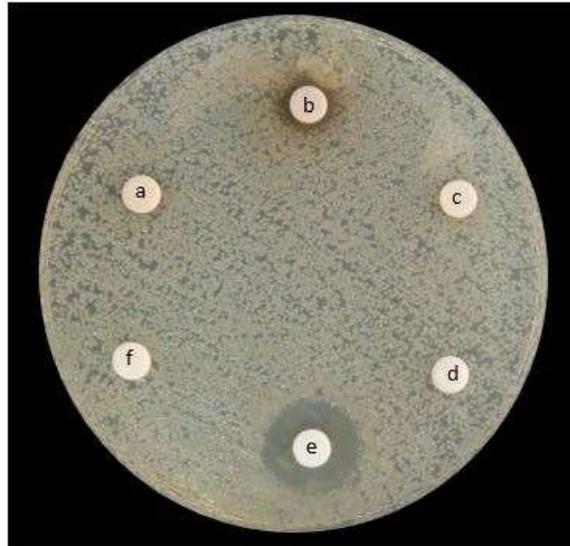


Figura 20. Difusión en disco de extractos proteicos de *M. beechii* (EPMB) a diferentes condiciones de pH contra *Salmonella Typhimurium*.

a) EPMB pH 5.7, b) EPMB pH 7, c) EPMB pH 8, d) Buffer de fosfatos pH 8, e) Ampicilina 20 μ g, f) Buffer de fosfatos pH 5.7

A comparación de otros compuestos químicos como los polifenoles, las proteínas se desnaturalizan a temperaturas relativamente bajas, Arntfield y Murray (1981) analizaron proteínas provenientes de diferentes fuentes vegetales y encontraron que la mayor temperatura de desnaturalización era 112°C. Esto puede deberse a distintos motivos; por un lado, dado que la mayoría de las proteínas se desnaturalizarían a esa temperatura y perderían su actividad antibacteriana, ésta estaría dada por otros compuestos que pudieran estar presentes en el extracto y que son estables a esas temperaturas, por ejemplo, compuestos fenólicos. Podría sugerirse también que los compuestos proteicos que presentan actividad antibacteriana del extracto proteico de *M. yucatanica* sean termorresistentes, como es el caso de algunos péptidos antibacterianos llamados bacteriocinas, que son producidos por bacterias y que pueden ser resistentes a temperaturas altas y por tanto ser de gran interés en la industria alimentaria (Tonarelli y Simonetta, 2013).

Las proteínas pueden ser desnaturalizadas de diversas formas, entre las que se encuentra el aumento de la temperatura y el cambio de pH, permitiendo la pérdida de estructuras secundaria,

terciaria y cuaternaria, lo que también se ve reflejado en la pérdida de la solubilidad y de la actividad biológica propia de la proteína (Tanford, 1968). Los cambios de pH a ácidos o alcalis pueden producir la precipitación de las proteínas por alcanzar el punto isoeléctrico, teniendo carga neta igual a cero, donde no es posible la solvatación de la molécula (Tanford, 1968).

Durante la extracción de proteínas con buffer de fosfato a pH ácido (5.7) y básico (8), posiblemente algunas de las proteínas presentes en la miel precipitaron y fueron desechadas durante la primera centrifugación, junto con los restos de polen. Así mismo, algunas otras proteínas pudieron perder su actividad antibacteriana por la pérdida de su estructura terciaria y secundaria, lo cual explicaría por qué no hubo inhibición contra *S. Typhimurium* por parte de los extractos de la miel de *M. beecheii* a pH ácido y básico, en comparación con el extracto a pH 7 (neutro), donde las proteínas se encuentran estables, y que mostró inhibir a la bacteria. En estudios alternos a éste, se ha determinado el punto isoeléctrico de algunas fracciones proteicas de la miel de *M. beecheii*, el cual se encuentra en un rango de pH 5, lo que corroboraría la pérdida de actividad a pH ácido. Sin embargo, el extracto proteico de *M. yucatanica*, continuó mostrando actividad a las diferentes condiciones de pH, e incluso se observó un incremento de la actividad a pH ácido, por lo que podría decirse que aquellas proteínas que presentan actividad antibacteriana son estables a un rango más amplio de pH, y que probablemente tenga un pH óptimo de acción alrededor de 5.7.

En la Figura 21 se observan las diferencias en color y turbidez de los distintos extractos proteicos, lo que nos indica un cambio según el pH del buffer de extracción. Este cambio puede deberse a diversos factores. Los compuestos que dan coloración a la miel de manera natural son los carotenoides y los compuestos fenólicos como ácidos fenólicos y flavonoides (Ciappini, Gatti y Di Vito, 2013). También se ha encontrado una relación entre el color de la miel y la cantidad de minerales, a mayor contenido de minerales es más oscura la miel (González-Miret *et al.*, 2005). Por tanto, el cambio en la coloración de los extractos puede ser resultado de la interacción de algunos de estos grupos carotenoides o fenólicos con las proteínas presentes, dando lugar a nuevos compuestos como el caso de las flavoproteínas, que al estar en un medio ácido o alcalino pueden cambiar el color del extracto. Existen estudios acerca de una flavoenzima llamada L-aminoácido oxidasa, que proporciona el color amarillo a los venenos de

serpientes y que presentan diversas propiedades, entre ellas la antibacteriana (Lazo *et al.*, 2007). El cambio de color puede deberse también a la concentración de proteínas, o a la precipitación de las mismas, lo que produce un efecto de turbidez, como en el caso de los extractos a pH ácido y básico de la miel de *M. beecheii*, o bien, resultando en la formación de un pellet como el caso del extracto ácido de la miel de *M. yucatanica*.

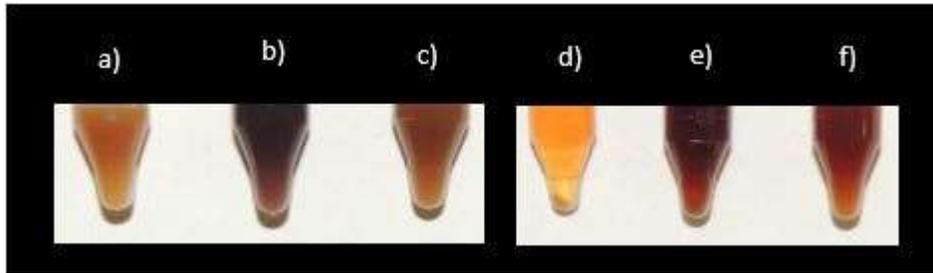


Figura 21. Extractos proteicos de mieles a diferentes pH.

- a) Extracto proteico de *M. beecheii* (EPMB) pH 5.7, b) EPMB pH 7, c) EPMB pH 8,
d) Extracto proteico de *M. yucatanica* (EPMY) pH 5.7, e) EPMY pH 7, f) EPMY pH 8.

Se exploró la posibilidad de un cambio en el perfil electroforético de los extractos proteicos, ya que un cambio de pH podría desnaturalizar e incluso degradar algunas proteínas y esto producir un cambio en la actividad antibacteriana. En la Figura 22 se observa que, si bien la concentración de proteínas de la muestra fue la misma (2 μ g) para cada condición de pH, la cantidad de bandas, así como su aparente concentración es diferente en cada caso, donde la muestra a pH ácido mostró la mayor cantidad de bandas, mientras que la intensidad de las mismas fue mayor a pH alcalino. Sin embargo, hay que recordar que únicamente la muestra a pH neutro inhibió el crecimiento de *S. Typhimurium*, por lo que probablemente la actividad corresponda a alguna banda que se encuentre únicamente en el perfil de pH 7. Para el caso de los extractos proteicos de la miel de *M. yucatanica* (Figura 23), el bandeo de las muestras a las tres condiciones de pH resultó similar al presentar las mismas 5 bandas superiores, donde posiblemente se encuentren las proteínas responsables de la actividad antibacteriana contra *S. Typhimurium*, que pudo apreciarse para los tres extractos; sin embargo, para concluir eso hacen falta más estudios. Este es el primer reporte donde se prueban extractos proteicos de mieles a diferentes concentraciones

de pH para observar su efecto antibacteriano, así como el análisis de los perfiles electroforéticos de los extractos.

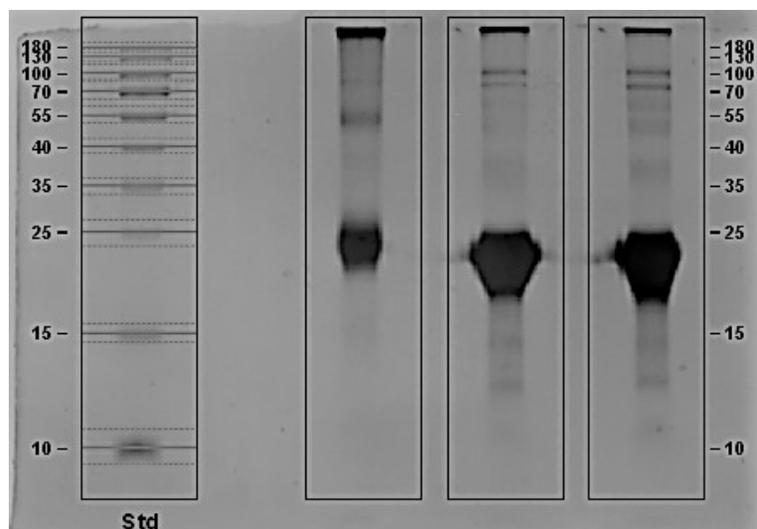


Figura 22. Perfil electroforético del extracto proteico de *M. beechii* obtenido a diferentes pH.

Std) Marcador de peso molecular 1) pH 7; 2) pH 5.7; 3) pH 8.

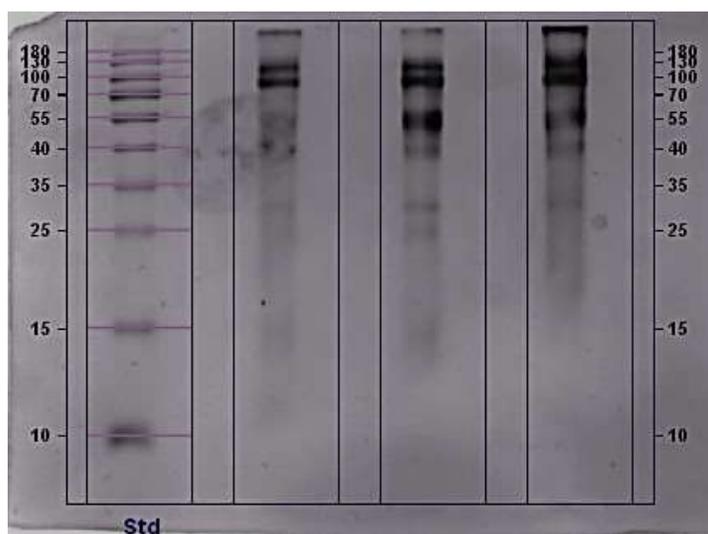


Figura 23. Perfil electroforético del extracto proteico de *M. yucatanica* obtenido a diferentes pH.

Std) Marcador de peso molecular 1) pH 7; 2) pH 5.7; 3) pH 8.

7.5 Actividad antimicrobiana. Concentración Mínima Inhibitoria

Las MIC determinadas en este ensayo se muestran en la Tabla 3. Las CMI determinadas para las mieles son comparables con lo obtenido por Anduaem (2013) para *Salmonella enterica* NCTC 8385 con una CMI de 12.5% de miel de abeja sin aguijón y el estudio realizado por Dardón y Enríquez (2008) para mieles de diferentes especies de abejas sin aguijón, entre ellas *M. beecheii* y *M. yucatanica aff.*, contra *Salmonella* Typhi obteniendo una CMI del 5% y del 10% respectivamente, donde al igual que en este estudio, el valor de la CMI de *M. yucatanica* es aproximadamente dos veces la CMI de *M. beecheii*. En cuanto a los extractos proteicos, *Salmonella* Typhimurium resulto ser 3 veces más susceptible a las proteínas de la miel de *M. yucatanica* en comparación a las proteínas de la miel de *M. beecheii*. Los resultados obtenidos sugieren que es probable que la concentración individual de las proteínas con actividad antibacteriana, no es suficiente para evidenciar el efecto en la miel de *M. yucatanica* o que se vea disminuida al estar en conjunto con otros componentes de la miel. Por el contrario, en el caso de la miel de *M. beecheii* hay otros compuestos como el peróxido de hidrógeno que contribuyen a la actividad antibacteriana, obteniendo una CMI menor.

Tabla 3.

Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI)

Miel (%)		Extracto proteico (µg/mL)	
<i>M. beecheii</i>	<i>M. yucatanica</i>	<i>M. beecheii</i>	<i>M. yucatanica</i>
10 ± 1	24 ± 1	200 ± 10	60 ± 10

7.6 Curvas de efecto antibacteriano por absorbancia

Las curvas de efecto antibacteriano fueron realizadas para determinar si los agentes utilizados tenían un efecto de tipo bacteriostático o bactericida sobre la bacteria, obteniéndose los siguientes resultados. En la Figura 24 se observa la tendencia mostrada por los antibióticos usados como comparativos para la tendencia de un agente bacteriostático (tetraciclina) y un agente bactericida (ciprofloxacino) contra *S. Typhimurium*, usando las CMI determinadas por Giraud *et al.* en el 2000. En la Figura 25, la miel de *M. beecheii* a concentración de 0.5, 1 y 2 veces la CMI, mostró una tendencia similar al antibiótico ciprofloxacino, por lo que sugiere una

tendencia bactericida, donde la absorbancia disminuye con respecto al tiempo. Por el contrario, la miel de *M. yucatanica* a concentración de 0.5, 1 y 2 veces la CMI, mostró una tendencia similar al agente tetraciclina (Figura 26), observándose un aumento en la absorbancia con respecto al tiempo, sugiriendo un comportamiento de tipo bacteriostático.

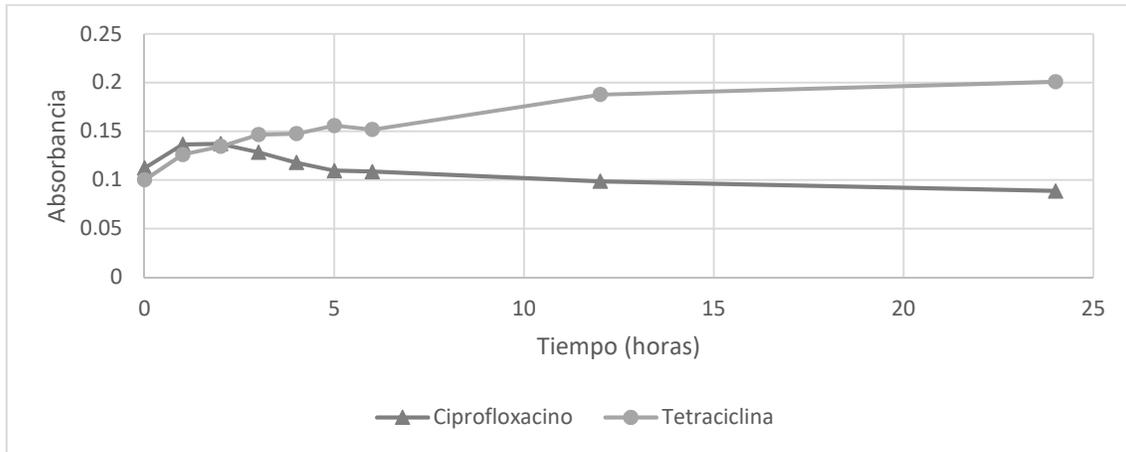


Figura 24. Efecto de un agente bactericida (ciprofloxacino) y un agente bacteriostático (tetraciclina) sobre *S. Typhimurium*.

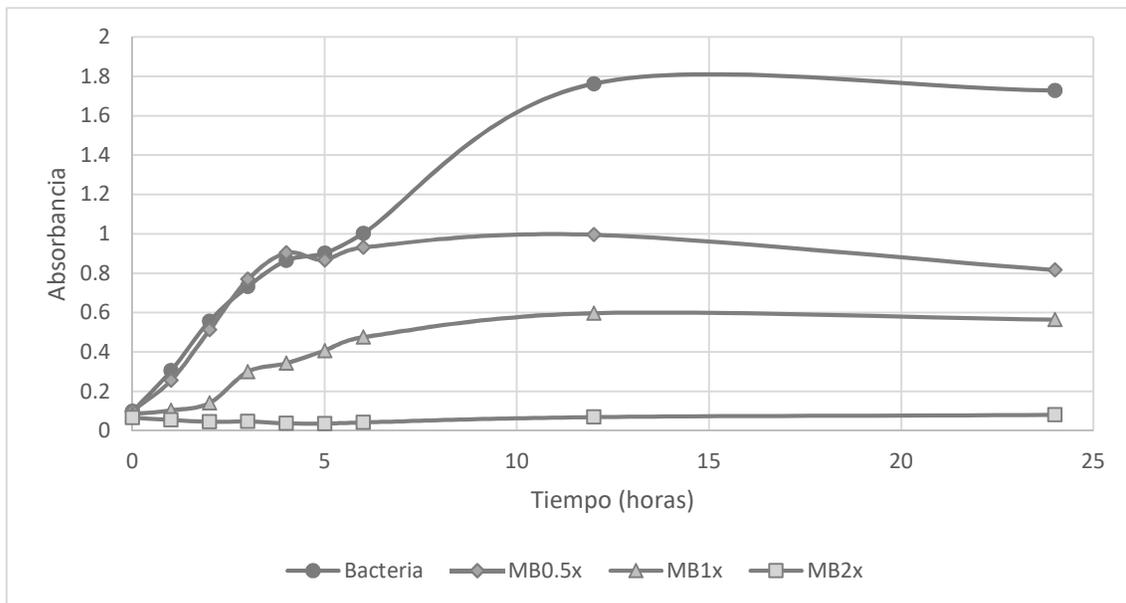


Figura 25. Efecto de la miel de *M. beecheii* a 0.5, 1 y 2 veces la CMI sobre *S. Typhimurium*.

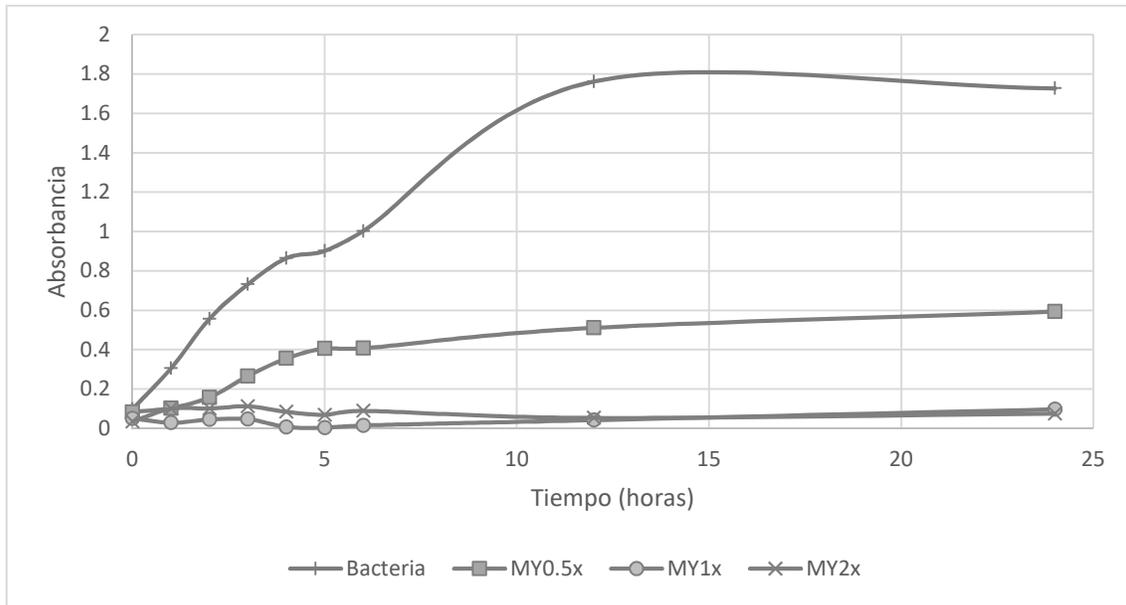


Figura 26. Efecto de la miel de *M. yucatanica* a 0.5, 1 y 2 veces la CMI sobre *S.*

Por otro lado, el extracto proteico de *M. beecheii*, que ya había mostrado una actividad bacteriostática en los ensayos de difusión en agar, volvió a mostrar una clara tendencia bacteriostática, como puede observarse en la Figura 27. En la Figura 28, se extendió el tiempo de toma de muestras para una mejor observación de la tendencia.

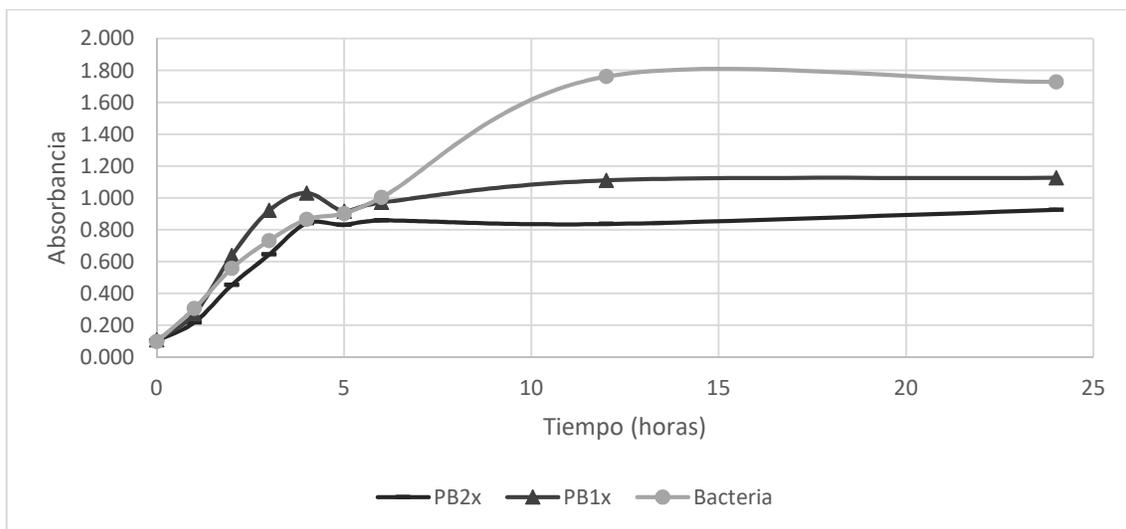


Figura 27. Efecto del extracto proteico de *M. beecheii* (PB) a 1 y 2 veces la CMI sobre *S.* Typhimurium.

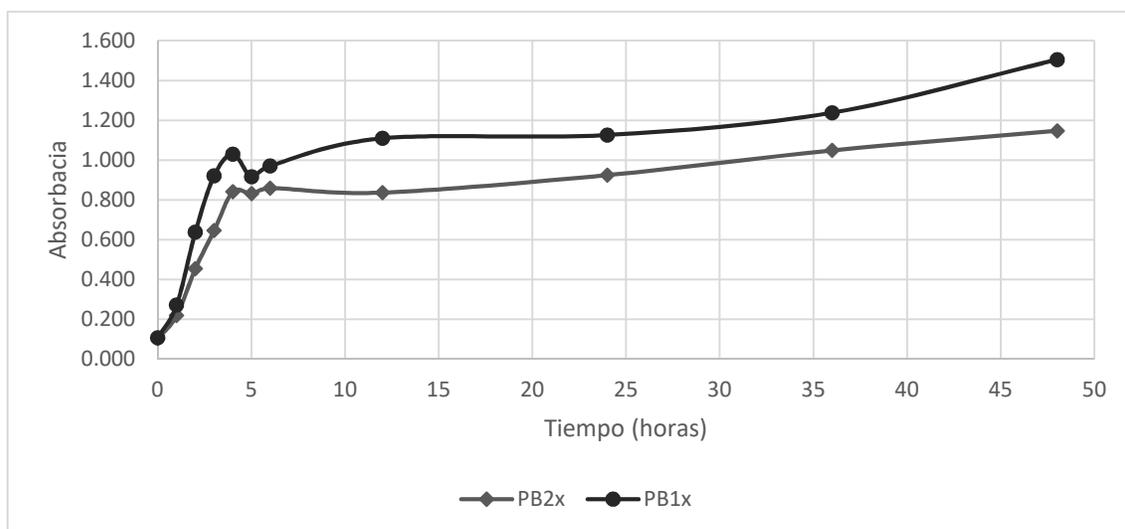


Figura 28. Efecto del extracto proteico de *M. becheii* (PB) a 1 y 2 veces la CMI sobre *S. Typhimurium*, durante 48 horas.

El extracto de la miel de *M. yucatanica* mostraba una tendencia igualmente bacteriostática (Figura 29); sin embargo, se había observado en los ensayos de difusión en disco que tenía un efecto más prolongado en la inhibición de la bacteria por lo que se realizó un conteo en placa correspondiente a la hora 0, 6, 12 y 24 del experimento. En la Figura 30, se muestran los resultados, observándose una disminución del 98% de UFC a la hora 24. Esta información complementa los resultados obtenidos debido a que las proteínas de esta miel tienen un mayor efecto de inhibición comparado con el obtenido con el extracto de la miel de *M. becheii*, y, por lo tanto, pudiera estar contribuyendo de forma muy importante en la actividad de la miel de *M. yucatanica*.

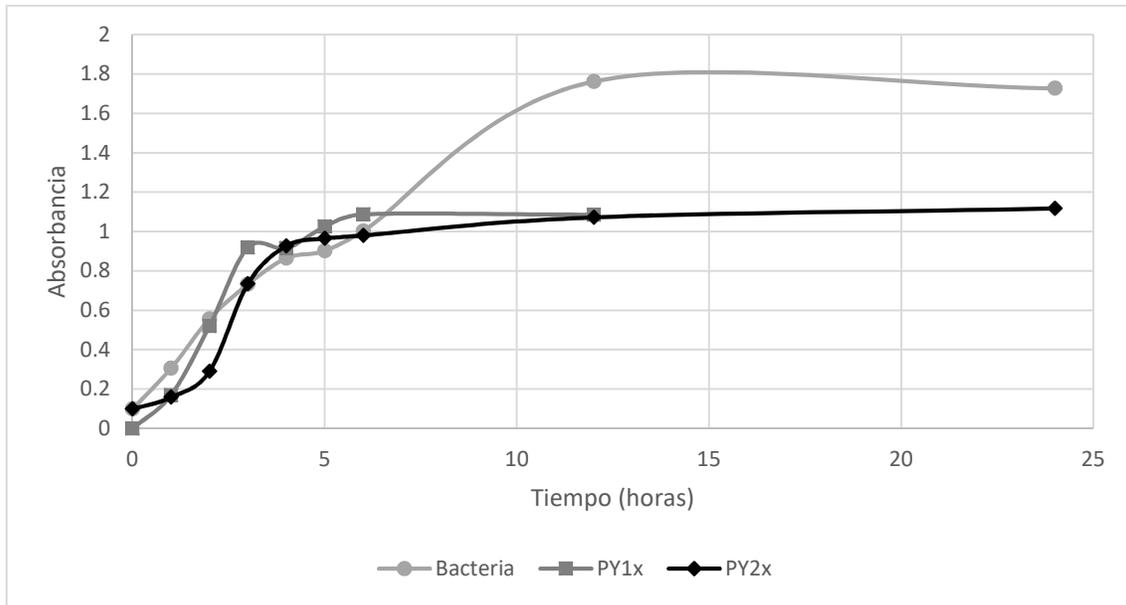


Figura 29. Efecto del extracto proteico de *M. yucatanica* (PB) a 1 y 2 veces la CMI sobre *S. Typhimurium*.

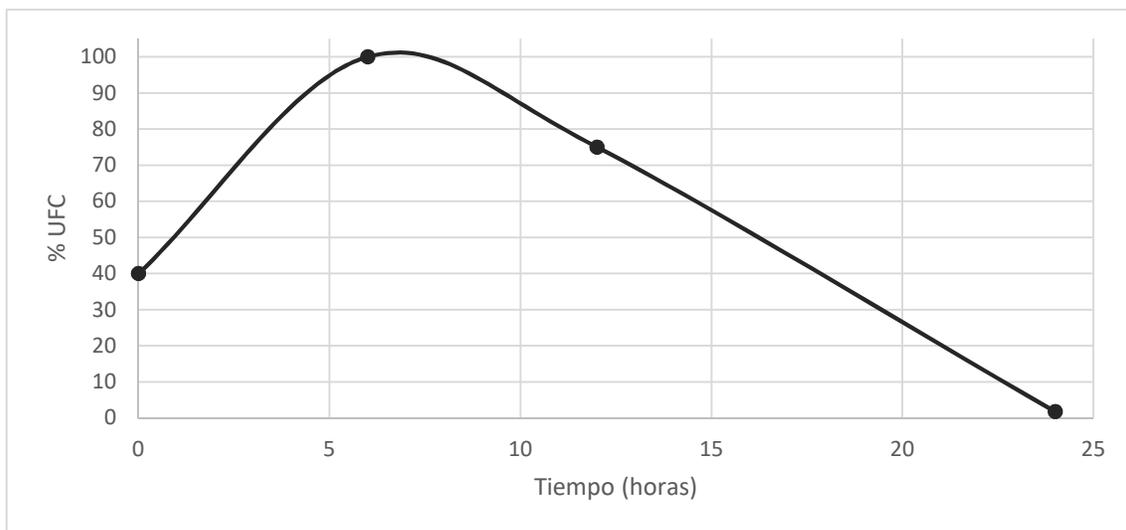


Figura 30. Porcentaje de UFC/mL de *S. Typhimurium*, en presencia del extracto proteico de *M. yucatanica* (PY) a 2 veces la CMI.

Capítulo 8. Conclusiones

- El perfil proteico sugiere la posibilidad de diferenciar entre dos mieles provenientes de abejas del mismo género, pero de diferente especie.
- Las mieles de *Melipona beecheii* y *Melipona yucatanica*, así como los correspondientes extractos proteicos, tuvieron actividad antibacteriana sobre *Salmonella Typhimurium*.
- La miel de *M. beecheii* tuvo efecto bactericida, mientras que la miel de *M. yucatanica* resultó ser del tipo bacteriostático.
- La temperatura y el pH afectan la estabilidad de la actividad antibacteriana del extracto proteico de la miel de *M. beecheii*.
- Las proteínas de la miel de *M. yucatanica* cuyo peso molecular es de 95 y 107 kDa aparentemente contribuyen de manera significativa a la actividad antimicrobiana contra *Salmonella Typhimurium*.
- La actividad antimicrobiana de la miel de *Melipona beecheii* se debe al efecto conjunto de todos sus componentes (fenoles, proteínas, péptidos y peróxido de hidrogeno).

Capítulo 9. Perspectivas

Para la complementación y continuación del presente trabajo, se sugiere aislar, purificar y caracterizar las proteínas presentes en las mieles, principalmente las provenientes de la miel de *M. yucatanica*, que suscitan especial interés por su actividad antibacteriana sobre *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311. Por otro lado, también se propone el estudio de otros componentes minoritarios de las mieles, como los compuestos fenólicos, que pueden estar contribuyendo de manera importante a la actividad antibacteriana de las mismas.

Bibliografía

1. Al-Nahari, A. A. M., Almasaudi, S. B., Abd El-Ghany, El S. M., Barbour, E., Al Jaouni, S. K. y Harakeh, S. (2015). Antimicrobial activities of Saudi honeys against *Pseudomonas aeruginosa*. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 22(5): 521-525.
2. Alvarez-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.
3. Anduaem, B. (2013). Combined antibacterial activity of stingless bee (*Apis mellipodae*) honey and garlic (*Allium sativum*) extracts against standard and clinical pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 3(9): 725-731.
4. Arntfield, S. D. y Murray, E. D. (1981). The influence of processing parameters on food protein functionality I. Differential scanning calorimetry as an indicator of protein denaturation. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*. 14(4): 289-294.
5. Ayala, R. (1999). Revisión de las Abejas sin Aguijón de México (Hymenóptera: Apidae: Meliponini). *Folia Entomológica Mexicana* (106): 1-123.
6. Baquero, L. y Stamatti, G. (2007). Cría y manejo de abejas sin aguijón. Tucumán: *Fundación Pro Yungas. Ediciones del Subtrópico*.
7. Barceló, R. (2011). La historia de la comercialización de la vainilla: de las abejas sin aguijón a la polinización manual. *Cuadernos de Nutrición*. 34(4): 151-157.
8. Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45(4): 493.
9. Bäumler, A. J., Tsois, R. M. y Heffron, F. (1996). Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity*. 64(5): 1862–1865.
10. Betancor, L. y Yim, L. (2012). *Salmonella* y salmonelosis. Recuperado el 7 de junio de 2017 de: http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Salmonella_y_salmonelosis.pdf

11. Bizerra, F. C., Da Silva, P. I. y Hayashi, M. A. F. (2012). Exploring the antibacterial properties of honey and its potential. *Frontiers in Microbiology*. 3: 398.
12. Bogdanov, S. (2009). Honey composition. Recuperado el 19 de septiembre de 2015, de Bee Product Science: www.bee-hexagon.net
13. Boorn, K. L., Khor, Y. Y., Sweetman, E., Tan, F., Heard, T. A. y Hammer, K. A. (2010). Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. *Journal of Applied Microbiology*. 108(5): 1534-1543.
14. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry Biochem*. 72: 248-254.
15. Brudzynski, K., Abubaker, K., St-Martin, L. y Castle, A. (2011). Re-examining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey. *Frontiers In Microbiology*. 2:213
16. Brudzynki, K. y Sjaarda, C. (2015). Honey glycoproteins containing antimicrobial peptides, jelleins of the Major Royal Jelly Protein 1, are responsible of the cell wall lytic and bactericidal activities of honey. *PLOS one*. 10(4): e0120238.
17. Bucekova, M. y Majtan, J. (2016). The MRJP1 honey glycoprotein does not contribute to the overall antibacterial activity of natural honey. *European Food Research and Technology*. 242: 625-629.
18. Bucekova, M., Sojka, M., Valachova, I., Martinotti, S., Ranzato, E., Szep, Z. y Majtan, J. (2017). Bee-derived antibacterial peptide, defensin-1, promotes wound re-epithelialisation *in vitro* and *in vivo*. *Scientific Reports*. 7: 7340.
19. Caffer, M.I., Terragno, R. y Binsztein, N. (2008). Manual de procedimientos: Diagnóstico y caracterización de *Salmonella spp*. Recuperado el 6 de febrero de 2017 de : http://bvs.panalimentos.org/local/File/manual_salmonella_2008.pdf
20. Calva, E. (2012). *Salmonella typhi* y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública. Recuperado el 6 de febrero de 2017 de: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap4/>

21. Camargo, J. M. F., Mouré, J. S. y Roubik, D. W. (1988). *Melipona yucatanica* new species (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae); stingless bee dispersal across the Caribbean Arc and post-Eocene vicariance. *Pan-Pacific Entomology*. 64:147-157.
22. Cárdenas-Perea, M. E., Cruz, O.R., Gándara-Ramírez, J.L. y Pérez-Hernández, M.A. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos*. 94: 35-43.
23. Carson, C.F., Hammer, K.A. and Riley, T.V. (1995) Broth microdilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Microbios*. 82:181-185.
24. Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M. y Temps, P. (1993). Functional and chemical characterization of *Hymenoptaecin*, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee *Apis mellifera*. *The Journal of Biological Chemistry*. 268(10): 7044-7054.
25. Chabalgoity, J., Pereira, M. y Rial, A. (2006). Inmunidad contra los agentes infecciosos. En Temas de Bacteriología y Virología Médica. *Departamento de Bacteriología y virología, Instituto de Higiene*. Montevideo, Argentina: FEFMUR. 109-114.
26. Chan-Rodríguez, D., Ramón-Sierra, J., Lope-Ayora, J., Sauri-Duch, E., Cuevas-Glory, L. y Ortiz-Vázquez, E. 2012. Antibacterial properties of honey produced by *Melipona beecheii* and *Apis mellifera* against foodborn microorganisms. *Food Science Biotechnology*. 21:905-909.
27. Chopra, I. y Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*. 65(2): 232-260.
28. Ciappini, M.C., Gatti, M. B., y Di Vito, M. V. (2013). El Color como indicador del contenido de flavonoides en miel. *Revista de Ciencia y Tecnología*. (19):59-63. Recuperado el 13 de octubre de 2017, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-75872013000100009&lng=es&tlng=es.
29. CODEX-STAN-012-1981. Norma del CODEX Alimentarius para la miel. Organización Mundial de la Salud. Revisión1, 1987.

30. Cona T., Erna. (2002). Requirements for the adequate of agar susceptibility test. *Revista Chilena de Infectología*. 19(2):77-81.
31. Dardón, M. y Enríquez, E. (2008). Caracterización fisicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (*Meliponini*) de Guatemala. *Interciencia*. 33(12): 916-922.
32. Dluya, T. (2015). Critical review: Antioxidant properties and antibiotic mechanism of honey against infectious diseases. *International Journal of Advances in Life Science and Technology*. 2(2):16-24.
33. Giraud, E., Cloeckaert, A., Kerboeuf, D. y Chaslus-Dancla, E. (2000). Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*: 44(5): 1223-1228.
34. Fakhri, S. F., Kucukyildiz, H. y Ishaque, S. (2013). A review on honeys antibacterial properties (Tesis doctoral).
35. Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T. y Kobayashi, K. (1990). A potent antibacterial protein in rojal jelly purification and determination of the primary structure of royalisin. *The Journal of Biological Chemistry*. 265(19): 11333-11337.
36. Glynn, M. K., Bopp, C., Dewitt, W., Dabney, P., Mokhtar, M. y Angulo, F. J. (1998). Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States. *New England Journal of Medicine*, 338(19): 1333-1339.
37. González Acereto, J. (2006). Cría de abejas meliponas e insumos locales para su alimentación. Mérida, Yucatán, México: *Protropico*. UADY.
38. González Acereto, J., y Quezada Euán, J. (2011). Producción tradicional de miel: abejas nativas sin aguijón (Trigonas y Meliponas). Recuperado el 7 de noviembre de 2015, de <http://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Sitios/Biodiversidad/pdfs/Cap7/19%20Produccion%20tradicional%20de%20miel.pdf>
39. González Acereto, J., Quezada Euán, J., y Medina Medina, L. (2015). New perspectives for stingless beekeeping in the Yucatan: results of an integral program to rescue and promote the activity. *Journal of Apicultural Research*. 45(4): 234-239.

40. González-Miret, M. L., Terrab, A., Hernanz, D., Fernández-Recamales, M. Á. y Heredia, F. J. (2005). Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(7): 2574-2580.
41. Hensel, M. (2004). Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology*. 294(2): 95-102.
42. Hooper, D. C. y Wolfson, J. S. (1989). Mode of action of the quinolone antimicrobial agents: review of recent information. *Reviews of Infectious Diseases*, 11(5): 902-911.
43. Huicochea Gómez, L. (2011). Dulce manjar: sabores, saberes y rituales curativos en torno a la miel de las meliponas. *Ecofronteras. A puertas abiertas*. 15(42): 22-25.
44. Huizar, R., Villarruel, R., Sánchez, T., Corrales, M. e Islas, A. (2004). Péptidos naturales antimicrobianos: escudo esencial de la respuesta inmune. *Investigación en Salud*. 6(3): 170-179.
45. Hancock, H. (2007). Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacterial. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 5: 951-959.
46. Jiménez, M. M. S. y Castro, N. M. C. (2003). Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Infectio*. 7(1): 22-29.
47. Jones, R. (2013). Stingless bees: a historical perspective. In Pot-Honey. *Springer New York*. 219-227.
48. Kumul, R. C., Ruiz, J. C. R., Vázquez, E. O. y Campos, M. R. S. (2015). Potencial antioxidante de la miel de *Melipona beecheii* y su relación con la salud: una revisión. *Nutrición Hospitalaria*. 32(4): 1432-1442.
49. Kwakman L. Boer L. Vandenbroucke C., Schultz Sebastian M. y Boszhard, L. (2011). Medical-grade honey enriched with antimicrobial peptides has enhanced activity against antibiotic-resistant. *European Journal Clinic Microbiologia Infect*. 30: 251-257.
50. Lambert, R. J. W. y Pearson, J. (2000). Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of applied microbiology*. 88(5): 784-790.

51. Lazo, F., Málaga, O., Yarlequé, A., Severino, R. y Gutiérrez, S. (2007). Actividad antimicrobiana de una flavoproteína aislada del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* ("jergón"). *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 73(4): 197-207.
52. Li, W-F., Ma, G-X. y Zhou, X-X. (2006). Apidaecin-type peptides: biodiversity, structure-function relationships and mode of action. *Peptides*. 27(9): 2350-2359.
53. López, L.B. y Valencia, M.E. (1999). Identificación de proteínas presentes en materias primas proteicas y en alimentos procesados. *Información Tecnológica*. 10 (2): 109-118.
54. Madigan M.T., Martinko J.M., Stahl D.A. y Clark D.P. Brock. (2012) *Biology of Microorganism*. 13^a ed. San Francisco: *Pearson Education*.
55. Madigan, L. M., Martinko, J. M. y Parker, J. (2003). *Brock Biología de los Microorganismos*. Madrid: *Prentice-Hall*.
56. Mandal, M. D. y Mandal, S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 1(2): 154-160.
57. Manyi Loh, C., Clarke, A. M. y Ndip, R. N. (2011). An overview of honey: Therapeutic properties and contribution in nutrition and human health. *African Journal of Microbiology Research*. 5(8): 844-852.
58. Manzo Gutiérrez, C. (2012). Las abejas nativas sin aguijón (Meliponini) en la Huasteca Potosina. Manual Técnico. San Luis Potosí, México.
59. Marcus, S. L., Brumell, J. H., Pfeifer, C. G. y Finlay, B. B. (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and Infection*. 2(2):145-156.
60. Matamoros N.F., Solórzano R., Zamora L.G., Arias M.L., Umaña E. y Aguilar I. (2013) Propiedades medicinales de la miel de abejas sin aguijón, de Costa Rica. Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales, Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar. Universidad Nacional (UNA).
61. McMurry, J. (2001). *Química Orgánica* (5^o ed.). México: *International Thomson Editors*.
62. Mendoza Patiño, Nicandro, y Campos Sepúlveda, A.E. (2009). Tetraciclinas. *Revista de la Facultad de Medicina. Actualidades farmacológicas*. 51(001)

63. Michener, C. (2007). The bees of the world. Baltimore: *The Johns Hopkins University Press*.
64. Molan, P. (1999). Why honey is effective as a medicine. Its use in modern medicine. *Bee world*. 80 (2): 80-92.
65. Molan, P. (2001). Why honey is effective as a medicine. The scientific explanation of its effects. *Bee World*. 82(1): 22-40.
66. Mølbak, K., Baggesen, D. L., Aarestrup, F. M., Ebbesen, J. M., Engberg, J., Frydendahl, K. y Wegener, H. C. (1999). An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *New England Journal of Medicine*. 341(19): 1420-1425.
67. Morales Gómez, M. L. y Troncoso González, A.M. (2012). Sustancias antinutritivas presentes en los alimentos. En Toxicología Alimentaria. Madrid: *Ediciones Díaz de Santos*.
68. Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L. y Ochoa, T. J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 28(4): 648-56.
69. Mulu, A., Tessema, B. y Derby, F. (2004). In vitro assessment of antimicrobial potential of honey on common human pathogens. *Ethiopian Journal of Health Development*. 18(2): 2: 107-111.
70. Ochoa, I. M. F. y Rodríguez, A. V. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella sp.* *Revista Latinoamericana de Microbiología*: 47(1-2): 25-42.
71. Olesen I, H. H. (2004). Prevalence of beta-lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microbial Drug Resistance*. 10(4): 334-340.
72. Orden Gutiérrez, J.A. y de la Fuente López, R. (2001). Repercusiones en la salud pública de la resistencia a quinolonas en bacterias de origen animal. *Revista Española de Salud Pública*. 75(4): 313-320.
73. Ortiz Vázquez, E., Cuevas Glory, L., Zapata Baas, G., Martínez Guevara, L. y Ramón Sierra, J. (2013). Which bee honey components contribute to its antimicrobial activity? A review. *African Journal of Microbiology Research*. 7(51): 5758-5765.

74. Ovalle, Y. y Reyes, Y. (1999) Aislamiento y serotipificación de *Salmonella spp.* a partir de alimentos obtenidos en diferentes zonas de Santafé de Bogotá, D.C. Trabajo de grado. *Pontificia Universidad Javeriana*.
75. Parra, M., Durango, J. y Máttar, S. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *Revista MVZ Córdoba*.7(2): 187-200.
76. Pascual- Anderson, M. (2005). Enfermedades de origen alimentario. Madrid: *Díaz de Santos*.
77. Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical biochemistry*. 83(2), 346-356.
78. Popoff M, Le Minor L. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. (1992) Paris: *Institute Pasteur*.
79. PROFECO. (2001). Calidad de la miel de abeja. Revista del Consumidor No. 287.
80. Quezada Euán, J. (2009). Potencial de las abejas nativas en la polinización de cultivos. *Acta Biológica Colombiana*. 14(2):169-172.
81. Quezada Euán, J. J. (2005). Biología y uso de las abejas sin aguijón de la península de Yucatán, México (Hymenoptera: Meliponini). Mérida, México: *Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán*.
82. Rahnamaeian, M., Cytrynska, M., Zdybicka-Barabas, A., Dobszlaff, K., Wiesner, J., Twyman, R. M., Zuchner, T., Sadd, B. M., Regoes, R. R., Schmid-Hempel, P. y Vilsinskas, A. (2015). Insect antimicrobial peptides show potentiating functional interactions against Gram-negative bacteria. *Proceedings of The Royal Society B*. 282 (1806); 20150293.
83. Ramirez, L. S. y Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*.15 (42): 263-268.
84. Ramón Sierra, J. M., Ruiz, J. C. y Ortiz Vázquez, E. L. (2015). Electrophoresis characterisation of protein as a method to establish the entomological origin of stingless bee honeys. *Food Chemistry*. 183: 43-48.
85. Rogan, P., Geraghty, P., Greene, M. C. y O'Neill, S. (2006). Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defense. *Respiratory Research*. 7(1): 29-29.

86. Ruiz, J. (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51(5): 1109-1117.
87. Sánchez, Mercedes. (2016). Mecanismos de acción de péptidos antimicrobianos y mecanismos de resistencia de los patógenos. *Asociación Bioquímica Argentina. Bioquímica y Patología Clínica*. 80(1): 36-43
88. Schwalbe, R., Steele M. L. y Goodwin, A. (2007). Antimicrobial susceptibility testing protocols. Estados Unidos: *Editorial CRC Press Taylor y Francis group*.
89. Schmitzová, J., Klauđiny, J., Albert, S., Schöder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Jůdová, J. y Simůth, J. (1998). A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 54(9): 1020-1030.
90. Schmidt, H., y Hensel, M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*. 17(1): 14-56.
91. Tanford, Charles. (1968). Protein Denaturation. *Advances in Protein Chemistry, Academic Press*. (23): 121-282.
92. Tonarelli, G., y Simonetta, A. (2014). Péptidos antimicrobianos de organismos procariotas y eucariotas como agentes terapéuticos y conservantes de alimentos. *FABICIB*.17:137-177.
93. Tůkel, Ć., Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R. P., Akĉelik, M. y Băumler, A. J. (2006). Neutrophil influx during non-typhoidal salmonellosis: who is in the driver's seat?. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 46(3): 320-329.
94. Ulloa, J. A., Mondragón, P., Rodríguez, R., Reséndiz, V. y Rosas, P. (2010). La miel de abeja y su importancia. *Revista Fuente*. 2(4): 11-18.
95. Uthurry, C. A., Hevia, D. y Gomez, C. (2011). Role of honey polyphenols in health. *Journal of Api Product and Api Medical Science*. 3(4): 141-159.
96. Vallianou, N., Gounari, P., Skourtis, A., Panagos, J. y Kazazis, C. (2014). Honey and its anti-inflammatory, anti-bacterial and anti-oxidant. *General Medicine*. 2(2): 2-132.
97. Villanueva-Gutiérrez, R., Colli-Ucán, W., Tuz-Novelo, M. y Gracia, M. A. (2013). Recuperación de saberes y formación para el manejo y conservación de la abeja *Melipona beecheii* en la Zona Maya de Quintana Roo, México. En *Stingless bees process*

- honey and pollen in cerumen pots. Venezuela: *Facultad de Medicina y Bioanálisis, Universidad de Los Andes*.
98. Vit, P., Vargas, O., López, T. y Maza, F. (2015). *Meliponini* biodiversity and medicinal uses of pot-honey from El Oro province in Ecuador. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 27(6): 502-506.
99. Vit, P. y Huq, F. (2013). Systematic reviews on interventions with honey in cancer. En *Stingless bees process honey and pollen in cerumen pots*. Venezuela: *Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes*.
100. Vit P., Medina M. y Enríquez M. E. (2004) Quality standards for medicinal uses of *Meliponinae* honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *Bee World*. 85(1): 2-5.
101. Vit, P. (2008). La miel precolombina de abejas sin aguijón (*Meliponini*) aún no tiene normas de calidad. *Revista. Boletín Centro de Investigaciones Biológicas*. 42(3): 415-423.
102. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. y Pérez-Álvarez, J. A. (2008). Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of food science*. 73(9): 117-124
103. White, A. P., Gibson, D. L., Collinson, S. K., Banser, P. A., y Kay, W. W. (2003). Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Journal of bacteriology*. 185(18): 5398-5407.
104. Wille, A. (1983). Biology of the stingless bees. *Annual Review of Entomology*. (28): 41-64.
105. Willey J.M., Sherwood L.M. y Woolverton C.J. (2010) Prescott's Microbiology. 8^a ed. New York: *McGraw-Hill*.
106. Wood, M. W., Jones, M. A., Watson, P. R., Hedges, S., Wallis, T. S., y Galyov, E. E. (1998). Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Molecular microbiology*. 29(3): 883-891.
107. Zaidi, M. B., López, C. y Calva, E. (2006). Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48(2): 121-125.

Otras referencias

- 1) Figura 3. <http://melipona.weebly.com/abeja.html>
- 2) Figura 4. <http://melipona.weebly.com/abeja.html>
- 3) Figura 5. <http://www.inriodulce.com/links/bees.html>