



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE MIELES DE ABEJA RECOLECTADAS EN LA  
REPÚBLICA MEXICANA SOBRE EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS DE  
IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**

**TESIS**

**PRESENTA**

**DANIELA RAMÍREZ ABUNDIZ**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ**



**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dra. GLORIA DÍAZ RUIZ  
**VOCAL:** Dra. PATRICIA SEVERIANO PÉREZ  
**SECRETARIO:** Dr. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ  
**1° SUPLENTE:** Dra. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO  
**2° SUPLENTE:** Dra. JESSICA GRANADOS PINEDA

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 111, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E, DIVISIÓN DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

## **ASESOR DEL TEMA:**

Dr. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ

## **SUSTENTANTE (S):**

DANIELA RAMÍREZ ABUNDIZ

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Química de Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar el estudio de licenciatura en Química de Alimentos

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz por su apoyo, tiempo y asesoría brindado para la realización de este trabajo.

A la Dra. Gloria Díaz Ruiz por las cepas bacterianas proporcionadas y por la ayuda en la revisión de este trabajo

A los miembros del jurado por la revisión de este trabajo.

Al proyecto PAIP 5000-9138 otorgado al Dr. José Fausto Rivero Cruz.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	I
ÍNDICE DE CUADROS.....	I
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	I
LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2 ANTECEDENTES.....</b>	<b>2</b>
2.1 MIEL.....	2
2.2 TIPOS DE ABEJAS.....	2
2.2.1 <i>APIS MELLIFERA</i> L.....	3
2.2.2 Meliponini.....	5
2.3 PROCESAMIENTO DE LA MIEL.....	7
2.4 PRODUCCIÓN NACIONAL DE MIEL.....	8
2.5 ZONAS APÍCOLAS.....	9
2.5.1 Zona del Norte.....	9
2.5.2 Zona Central.....	10
2.5.3 Zona del Pacífico.....	10
2.5.4 Zona del Golfo de México.....	10
2.5.5 Zona de la Península de Yucatán.....	11
2.6 COMPOSICIÓN DE LA MIEL.....	12
2.6.1 Agua.....	13
2.6.2 Enzimas.....	13
2.6.3 Proteínas y aminoácidos.....	14
2.7 PROBLEMÁTICA DE BACTERIAS RESISTENTES.....	14
2.8 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MIEL.....	15

2.9	BACTERIAS DE IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA	
ALIMENTICIA.....		18
2.9.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	18
2.9.2	<i>Salmonella</i> Typhimurium.....	21
2.9.3	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	23
2.9.4	<i>Escherichia coli</i> .....	24
2.9.5	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena.....	24
2.9.6	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica.....	25
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>26</b>
3.1	Objetivo general.....	26
3.2	Objetivos particulares.....	26
3.3	Justificación.....	26
<b>4</b>	<b>DESARROLLO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>28</b>
4.1	Recolección.....	29
4.2	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.....	29
4.3	Determinación de la Concentración Mínima Bactericida.....	31
<b>5</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
5.1	Recolección de muestras.....	33
5.2	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.....	38
5.3	Determinación de la Concentración Mínima Bactericida.....	43
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>47</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>48</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>54</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Especies de abejas: <i>Apis mellifera</i> , <i>A. cerana</i> , <i>A. dorsata</i> , <i>A. florea</i> ..	<b>3</b>
<b>Figura 2.</b> Clasificación científica de las abejas.....	<b>4</b>
<b>Figura 3.</b> Zonas apícolas en la República Mexicana.....	<b>12</b>
<b>Figura 4.</b> Diagrama de proceso experimental.....	<b>28</b>
<b>Figura 5.</b> Distribución de las muestras en las microplacas.....	<b>30</b>
<b>Figura 6.</b> Ejemplo de microplaca para la determinación de la concentración mínima bactericida.....	<b>44</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Entidades federativas con mayor producción de miel en mayo del 2018.....	<b>9</b>
<b>Cuadro 2.</b> Carbohidratos presentes en la miel.....	<b>13</b>
<b>Cuadro 3.</b> <i>Staphylococcus aureus</i> : toxinas y efectos biológicos.....	<b>19</b>
<b>Cuadro 4.</b> Tipos de infecciones causados por <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	<b>22</b>
<b>Cuadro 5.</b> Origen, color, estado físico, apariencia y observaciones de las muestras de mieles utilizadas para las pruebas del efecto antibacteriano.....	<b>33</b>
<b>Cuadro 6.</b> Concentración Mínima Inhibitoria (% p/v) de 60 muestras probadas sobre <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Escherichia coli</i> enteropatogénica y <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica.....	<b>41</b>
<b>Cuadro 7.</b> Concentración Mínima Bactericida (% p/v) de 60 muestras probadas sobre <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Escherichia coli</i> enteropatogénica y <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica.....	<b>45</b>

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Concentración Mínima Inhibitoria de mieles para seis bacterias patógenas frecuentes en alimentos .....	<b>39</b>
<b>Gráfica 2.</b> Concentración Mínima Bactericida de mieles para seis bacterias patógenas frecuentes en alimentos .....	<b>43</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS	TERMINOLOGÍA
Aw	Actividad de agua
ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos
IAE	Intoxicación Alimentaria Estafilocócica
IBRA	International Bee Research Association
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
MBC	Concentración Mínima Bactericida
UFC	Unidades formadoras de colonias
TSST-1	Toxina-1 del síndrome de shock tóxico
EPEC	Enteropatógena
EHEC	Enterohemorrágica
ETEC	Enterotoxigénica
EAEC	Enteroagregativa
EIEC	Enteroinvasiva
DAEC	De adherencia difusa
OMS	Organización Mundial de la Salud
m	metro
km	kilómetro
mm	milímetro
cm	centímetro
kg	kilógramo
ng	nanogramo
ml	mililitro
h	hora
°C	Grados celsius
%	Porcentaje



## **1. INTRODUCCIÓN**

La miel es un producto natural, el cual ha sido consumido no solo por su valor nutricional, sino por sus beneficios a la salud ya que generalmente se asocia con propiedades medicinales. Es utilizado para curar heridas y quemaduras, así como dolores de garganta. Estudios recientes han demostrado que la miel tiene un efecto hematoprotector, hipoglucémico, antihipertensivo, gastroprotectivo, anti-inflamatorio, antioxidante, antifúngico y antimicrobiano. Los efectos proporcionados por la miel dependen de su composición (Soares et al., 2015).

El origen botánico, área geográfica, tecnología utilizada al momento de la extracción, condiciones de almacenamiento son factores que afectan a la composición, características organolépticas y fisicoquímicas de la miel como color, sabor, aroma, grado de humedad y contenido de azúcares (Soares et al., 2015).

Actualmente, la producción mundial de miel es de 1,1 millones de toneladas, donde seis países como China, Estados Unidos, Argentina, México, Canadá y Alemania concentran la mitad del total. México ocupó el quinto lugar mundial como productor y exportador de miel de abeja en el año 2015, con un promedio de 26 mil 600 toneladas. Alrededor del 40 y 50% de lo producido, tiene como destino final Alemania, Inglaterra y Estados Unidos (Soto et al., 2017). Debido a que los requerimientos de miel están en crecimiento, las exigencias de calidad por los consumidores también lo hacen, obligando a la producción mexicana a incrementar sus estándares de calidad para asegurar la competitividad de los productos. Esto es una gran limitante ya que la mayoría de los productores mexicanos no cumplen con la normatividad del origen floral de sus mieles, establecidas por la Comisión de Botánica Apícola y por el IBRA (International Bee Research Association) (Díaz et al., 2009).

De acuerdo con la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en mayo del 2018, los estados con mayor producción de miel en México son Jalisco con una producción de 5,815 toneladas, Chiapas con 5324 toneladas y Veracruz con 4,704 toneladas.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 LA MIEL

La miel es una sustancia dulce natural producida por abejas *Apis mellifera* a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de éstas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas y que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, y depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure y añeje (CODEX, 1981). La miel tiene un rango de actividad de agua de 0.562 a 0.620, el pH se encuentra en un rango de 3.2 a 4.5. La acidez está determinada por el contenido de ácido glucónico (Vorlova et al., 2005).

Existen dos tipos de mieles:

- Miel de flores o miel de néctar: miel la cual procede del néctar de las plantas. Se puede clasificar en:
  - Monoflorales: miel cuya composición destaca el néctar de una especie vegetal en específico, como las mieles de aguacate, naranja, etc. Se caracterizan por determinadas características, sobre todo el contenido de néctar de esta clase debe ser mayor del 45% para una especie (Pozo y Michelle, 2016).
  - Poliflorales: miel cuya composición presenta néctar de distintas especies vegetales, considerando que ningún tipo de néctar representa el 45% en su totalidad (Pozo y Michelle, 2016).
- Miel de mielada: miel que procede principalmente de excreciones que los insectos succionadores (Hemiptera) dejan sobre las partes vivas de las plantas, o de secreciones de partes vivas de las plantas (CODEX, 1981).

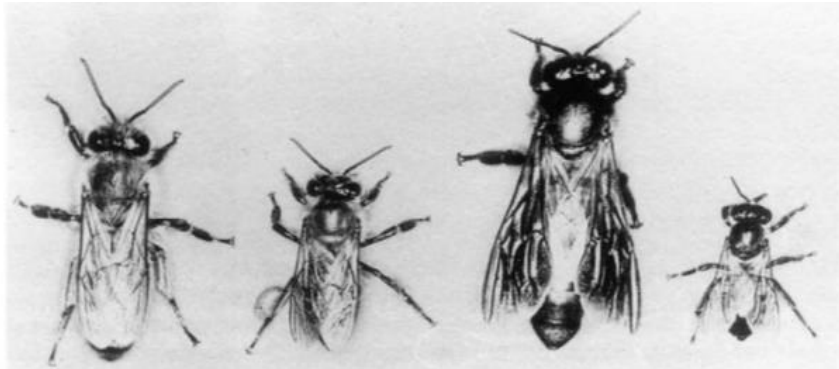
### 2.2 TIPOS DE ABEJAS

Existen dos grandes grupos de abejas productoras de miel: aquellas con aguijón (*Apis mellifera*) y sin aguijón (*Apidae: Meliponini*). Al comparar la miel

de los melipónidos con la miel producida por *Apis mellifera*, se encuentra que ésta tiende a ser más líquida, más ácida y su composición no es idéntica, lo cual puede marcar una diferencia en el efecto que puedan presentar sobre los microorganismos (Zamora y Arias, 2011).

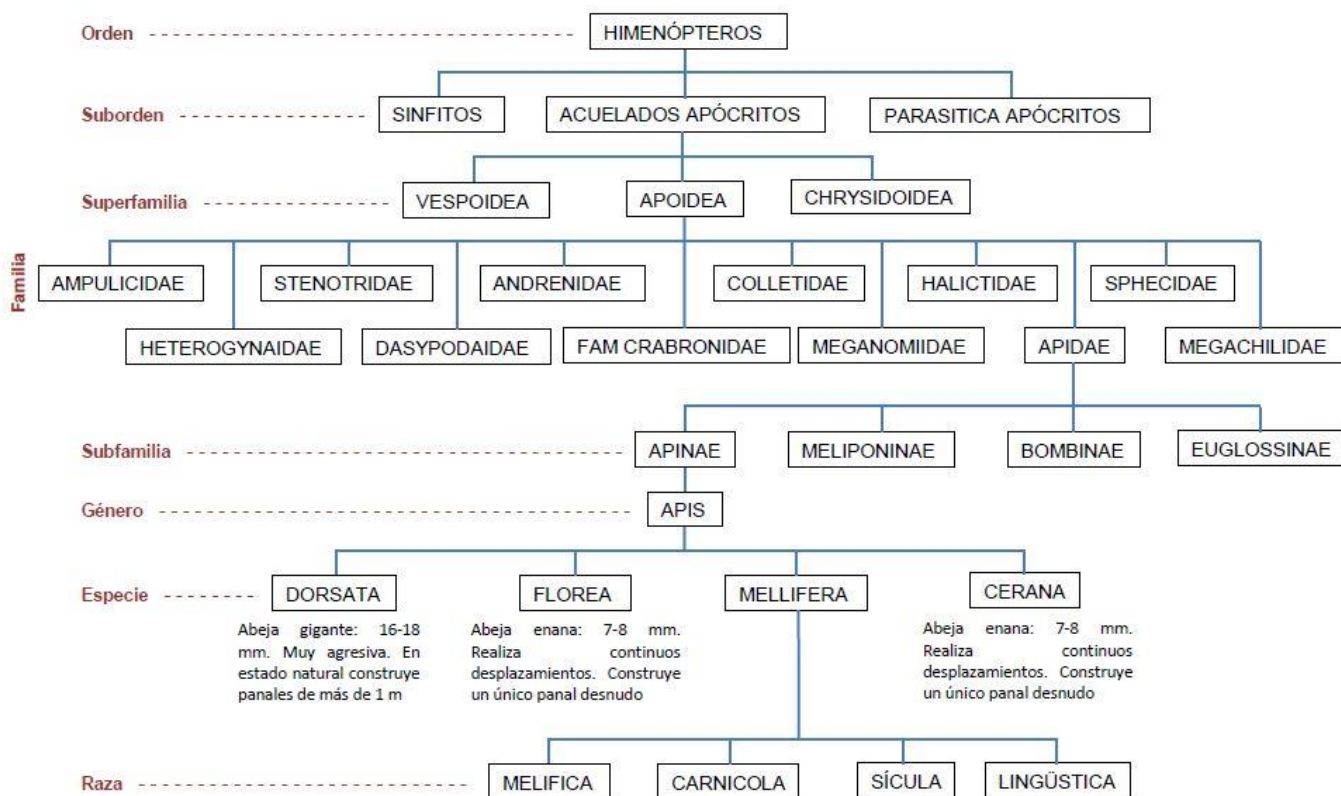
### 2.2.1 *Apis mellifera*

La abeja de la miel *Apis mellifera* pertenece al orden de los himenópteros a la familia Apiade y al género *Apis*; este género comprende 4 especies *Apis mellifera*, *Apis cerana*, *Apis dorsata* y *Apis florea* (Figura 2). Entre ellas solo tienen algunas diferencias morfológicas (Figura 1), pero se caracterizan por tener panales verticales con celdas hexagonales construidas bilateralmente y únicamente con cera elaborado por ellas mismas, se comunican y se reclutan a través de danzas, tienden a reutilizar sus celdas (Ruttner, 2013).



**Figura 1.** Especies de abejas: *Apis mellifera*, *A. cerana*, *A. dorsata*, *A. florea* (De izquierda a derecha) (Ruttner, 2013).

## CLASIFICACIÓN DE LAS ABEJAS



**Figura 2.** Clasificación científica de las abejas. Modificado de Ravazzi, 2017.

Las abejas *Apis mellifera* son una de las especies más exitosas en el reino animal. Son las abejas domésticas y se encuentran en zonas tropicales de Europa (Zona Mediterránea) y África, de las cuales se extendió al resto del mundo. Esta especie es capaz de sobrevivir en regiones semidesérticas, tropicales, así como en zonas frías-templadas. La variedad fenotípica de las especies incluye su comportamiento y su morfología, esto incluye ciertas características como su reacción al frío y que tan susceptibles son a enfermedades (Ruttner, 2013).

*Apis cerana* es la contraparte del Este asiático de *A. mellifera*. Su morfología y su comportamiento es muy similar a *A. mellifera*, tanto que antes se consideraba como una subespecie de está, sin embargo, tienen diferencias genéticas. Los requerimientos ambientales son los mismos que *A. mellifera* aunque también ha logrado colonizar zonas boscosas en la zona templada-

fresca. Se resguardan en colmenas y sus colonias son más pequeñas que las colonias de *A. mellifera* (Rinderer, 2013; Ruttner, 2013).

*Apis dorsata* se distribuye de tal manera que incluye el sur de China, Célebes y Timor, pero no incluye Irán y la Península Arábiga. Se encuentran en altitudes superiores a los 2000 m. *Apis dorsata* es la abeja más larga. Tienen dos comportamientos muy característicos. El primero es que tienen una reacción de defensa muy organizada. Cuando la colonia es molestada se forman grupos de abejas alertadas, las cuales se cuelgan en la parte inferior del panal y se dejan caer. Este grupo de abejas es activado para la defensa del panal. Posteriormente, el intruso es picado para dejar el olor de una feromona específica (2-decen-1-il-acetato), con este olor el intruso puede ser perseguido por kilómetros. Sin embargo, *A. dorsata* puede acostumbrarse a la presencia de humanos, por lo que puede llegar a tener panales en el centro de ciudades concurridas sin mostrar sus actividades de defensa. El segundo comportamiento característico es que migra a locaciones con una distancia de 100 – 200 Km (Rinderer, 2013; Ruttner, 2013).

*Apis florea* vuela arriba de los 500 m, sin embargo, las migraciones estacionales se realizan arriba de los 1500 m. Durante el invierno, las colonias de *A. florea* anidan en las paredes de las casas para tener cierta protección y durante el verano lo hacen en la sombra de los árboles y arbustos. Se encuentran en las zonas tropicales de Asia. *Apis florea* se encuentra distribuida en las costas del Golfo Pérsico, Pakistán, India, Tailandia, Malasia, Indonesia y Filipinas. *A. florea* es un polinizador muy eficiente (Rinderer, 2013).

### **2.2.2 Meliponini**

Meliponini y Bombinae son los parientes más cercanos de las abejas. Las abejas sin aguijón o meliponas son un grupo de insectos sociales que habitan áreas tropicales y subtropicales. Son nativas del Continente Americano donde se han identificado más de 350 especies (Baquero y Stamatti, 2007). Se distinguen fácilmente de otros géneros de la subfamilia por su aspecto robusto, generalmente grandes (8-15 mm largo), con alas que no sobrepasan la longitud del cuerpo. Estas abejas son las únicas que producen numerosas reinas

pequeñas en celdas que son iguales a aquellas en las que se crían a las obreras (Nates, 1995).

Los meliponinos se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales del mundo, teniendo su centro de diversificación en el Neotrópico Americano, distribuyéndose desde México hasta Argentina. La mayoría de las abejas meliponas visitan flores para obtener néctar y polen, sin embargo, también hay algunas especies que se alimentan del polen y la miel de otras colonias de meliponas (Guzmán et al., 2011).

Las abejas meliponas construyen nidos en casi cualquier cavidad disponible como árboles vivos o muertos, rocas y paredes a alturas que van desde 50cm a 5 m. La entrada de los nidos puede ser un orificio o un tubo. Las entradas del orificio pueden ser simples, donde únicamente cabe una abeja o donde presentan estrías radiales hechas de barro. Cuando las entradas son de tubo, se presenta la forma de una trompeta aplanada, hecha de cerumen mezclado con barro, duro y con bordes festoneados. Sus panales son horizontales, dispuestos uno sobre otro, pero con espacio suficiente entre ellos para ventilación y circulación de las abejas (Nates, 1995).

A pesar de que algunas especies del género *Melipona* son mansas y su única defensa es huir, existen otras que son muy agresivas y atacan por medio de mordiscos y depósito de sustancias resinosas sobre la piel del intruso, especialmente cuando se irrumpen en la entrada del nido y más cuando hay perturbación a su cámara de cría (Nates, 1995).

Su sistema de comunicación no es tan especializado como el de *Apis mellifera*. Cuando la abeja pecoreadora llega a la colmena se muestra muy excitada, de tal manera que llama la atención de quienes la observan al interior de la colmena. Emite diferentes tipos de zumbidos, los zumbidos largos los realiza cuando el camino a recorrer es largo y los zumbidos cortos significan que la fuente está muy próxima a la colmena, después sale y se dirige hacia la fuente, dejando un rastro de huellas olorosas, con distancia de 2-7 m entre huella y huella para informar la dirección (Kerr, 1994).

### **2.3 PROCESAMIENTO DE LA MIEL**

La elaboración de la miel comienza cuando las abejas realizan la recolección del néctar y el polen de las flores, del cual solo el néctar es utilizado para la producción de la miel. El polen es transportado en una canasta de polen llamada corbícula, la cual se encuentra en las patas traseras de la abeja, mientras el néctar se transporta en el estómago. El néctar es principalmente agua con azúcares disueltos, la cantidad de azúcar varía bastante, pero se encuentra en un rango del 25% al 70%, este es succionado por la abeja al insertar su probóscide en las flores nectarías, pasándolo de su esófago a su tórax y finalmente a su abdomen. En la colmena, la abeja regurgita el fluido y pasa a través de su probóscide a una o más abejas, que la tragan y la regurgitan también. Cada que una abeja succiona el líquido a través de su probóscide hacia el buche, una pequeña cantidad de proteínas se añade y agua se evapora, posteriormente el néctar es colocado en las células de cera del panal que se encuentran a una temperatura aproximada de 30 °C donde el exceso de agua comienza a evaporarse hasta que tenga aproximadamente un 17 % de agua y 83 % de azúcares. Este proceso toma sólo unos cuantos días. Las células son cubiertas con una capa de cera, la cual es removida cuando la abeja necesite alimentarse de miel. En este momento la miel se considera madura y no fermentará (Bradbear, 2009). Las abejas aceleran la evaporación del agua de la miel al ventilar la colmena con ayuda de sus alas.

Una vez que la miel está madura en la colmena se realiza el desoperculado, el cual consiste en la remoción de los opérculos con los que las abejas han cerrado las celdas del panal con la ayuda de un cuchillo de acero inoxidable caliente y afilado, comenzando de arriba hacia abajo. Los panales son colocados en una centrífuga y de esta manera la miel es totalmente removida (Olaitan et al., 2007). Al comenzar el giro debe ser lento para que los panales no se rompan, después de dos minutos se debe ir aumentando la velocidad (SAGARPA, 2003). La miel también puede ser removida con presión sobre los panales pero estos son necesariamente destruidos y puede llegar a reducir la cantidad de cera en la miel (Olaitan et al., 2007).

La miel al ser centrifugada sale con impurezas como pedazos de panal, abejas muertas, partículas de propóleos, cera, etc. Es por esto por lo que la miel es filtrada, utilizando una malla de 2 × 3 mm de abertura, después se pasa por un proceso de sedimentación, el cual consiste en la separación de las partículas e impurezas presentes en la miel a través del reposo (SAGARPA, 2018). La miel se deja en tanques sedimentadores por 72 horas, las impurezas quedan en la parte de arriba por lo que se saca la miel completamente limpia por una válvula inferior (SAGARPA, 2003). Posteriormente, se continúa con el proceso de envasado, este se puede realizar en tambores o en frascos (SAGARPA, 2018). La miel no debe ser calentada o procesada de tal manera que cause cambios en la composición o que afecte su calidad (Bradbear, 2009).

## **2.4 PRODUCCIÓN NACIONAL DE MIEL**

México ocupa el quinto lugar como productor mundial de miel, esto en beneficio de más de 57 mil apicultores que operan poco más de 2 millones de colmenas (Soto et al., 2017). La producción de miel en México en los últimos 4 años supera las 56 mil 300 toneladas en promedio, México también es el quinto lugar en términos de valor de la exportación a nivel mundial, con un promedio de 26 mil 600 toneladas (entre el 40 y 50 % de los producido), las cuales tienen como destino principal Alemania, Inglaterra y Estados Unidos, lo que genera ingresos anuales en promedio de 32.4 millones de dólares (SAGARPA, 2018). Los requerimientos de miel a nivel mundial están en crecimiento, así como las exigencias de calidad por los consumidores, obligando a la oferta mexicana tradicional de regiones como Nayarit, Jalisco y Michoacán a incrementar sus estándares de calidad, como condición para asegurar la competitividad de sus productos (CONACyT, 2018).

En el año 2016, las entidades federativas con mayor producción de miel de abeja fueron: Yucatán, Jalisco, Chiapas y Campeche quienes generaron el 42% del volumen y el 38.3% del valor total de la producción nacional (CONACyT, 2018). Actualmente, los estados con mayor producción de miel son los estados de Jalisco con una producción de 5,815 toneladas, Chiapas con 5324 toneladas y Veracruz con 4,704 toneladas (Cuadro 1) (SAGARPA, 2018).



**Cuadro 1.** Entidades federativas con mayor producción de miel en Mayo del 2018 (SAGARPA, 2018).

Entidad federativa	Producción de miel (toneladas)
Jalisco	5,815
Chiapas	5,324
Veracruz	4,704
Yucatán	4,351
Oaxaca	4,078
Campeche	3,767

## 2.5 ZONAS APÍCOLAS

México se divide en cinco regiones apícolas (Figura 3), dependiendo del suelo, clima y vegetación predominante. Cada región apícola cuenta con diferentes grados de desarrollo.

### 2.5.1 Zona del norte

Tiene una extensión aproximada de 930,000 Km<sup>2</sup>, los estados que integran esta región son Baja California, Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, Durango, Zacatecas, Coahuila, Nuevo León y parte norte de Tamaulipas y altiplano de San Luis Potosí (SAGARPA, 2010). Se estiman 156, 498 colmenas en esta región, propiedad de 2,238 productores, los cuales obtienen aproximadamente 3,571 toneladas de miel con un rendimiento promedio por colmena de 23 Kg y 157 toneladas de cera. A pesar de ser la región con mayor extensión, su apicultura se encuentra poco desarrollada debido a sus tipos de vegetación ya que presenta una estación invernal adversa.

Su vegetación es de tipo xerófila, las épocas de floración más importantes se presentan de marzo a mayo y en las tierras de mayor precipitación ocurren también de agosto a octubre (Correa y Guzmán, 2006).

Esta región se caracteriza por la producción de miel de mezquite, miel extra clara ámbar que se destina principalmente a mercados fuertes como EUA (SAGARPA, 2010).

### **2.5.2 Zona Central**

También conocida como región altiplano, contiene una superficie aproximada de 390,000 Km<sup>2</sup> y comprende los estados de Tlaxcala, Puebla, Estado de México, Morelos, Ciudad de México, Guanajuato, Aguascalientes, la parte oriente de los estados de Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas y parte poniente de Hidalgo y Querétaro, así como la región media de San Luis Potosí (SAGARPA, 2010). Su vegetación se comprende principalmente de matorral xerófilo, bosque espinoso, pastizal, bosque de coníferas, bosque de encinos y bosque tropical caducifolio. Su clima es subtropical de tierras altas y presenta dos épocas de floración: la primera en abril-mayo en plantas perennes y la segunda de septiembre-noviembre en plantas anuales (Labougle y Zozaya, 1986). Cuenta con aproximadamente 444,897 colmenas, propiedad de 7,933 apicultores, que producen al año 12,392 toneladas de miel con un rendimiento por colmena de 28 Kg y 643 toneladas de cera. Una limitante de esta región es que en algunos años se presentan heladas tempranas y por el contrario en las partes bajas se llegan a tener precipitaciones insuficientes, lo que provoca malas cosechas de miel (Correa y Guzmán, 2006).

### **2.5.3 Zona del Pacífico**

Tiene una superficie aproximada de 260,000 Km<sup>2</sup> y está formada por los estados de Sinaloa, Nayarit, Colima, el poniente de Jalisco y Michoacán, así como parte de Guerrero, Oaxaca y Chiapas (SAGARPA, 2010). Su vegetación predominante son los bosques tropicales caducifolios y subcaducifolios, aunque también llega a presentar bosques espinosos, bosques con coníferas y encinos. Esta región cuenta con 377,276 colmenas, propiedad de 6,258 apicultores y obtienen anualmente 12,226 toneladas de miel con un rendimiento promedio por colmena de 32 Kg y 802 toneladas de cera. La época más importante de floración ocurre entre octubre y diciembre, especialmente en plantas anuales (Correa y Guzmán, 2006).

### **2.5.4 Zona del Golfo de México**

Tiene una superficie aproximada de 250,000 Km<sup>2</sup>, comprende desde la vertiente de la Sierra Madre Oriental hasta la costa del Golfo de México. Se destaca por poseer una gran producción de miel de cítricos y miel ámbar clara

producida a partir de la flor de naranjo (SAGARPA, 2010). La mayor parte del territorio está cubierta por un bosque tropical perennifolio. Existen 271,307 colmenas, propiedad de 2,516 apicultores, con una producción de 10,148 toneladas de miel con un rendimiento promedio por colmena de 37 Kg y 548 toneladas de cera. Las fechas importantes de floración se realizan en noviembre y durante los meses de abril a junio. El potencial apícola de la región es bueno, limitado en el sur por el exceso de lluvias y en el extremo norte por heladas y sequías (Correa y Guzmán, 2006).

### **2.5.5 Zona de la Península de Yucatán**

Comprende los estados de Yucatán, Campeche y Quintana Roo y parte de los estados de Chiapas (Noreste) y Tabasco (Oriente) (SAGARPA, 2010) con una superficie aproximada de 140,000 Km<sup>2</sup>. En el noreste su vegetación predominante es el bosque tropical caducifolio, seguido por una franja diagonal de bosque tropical subcaducifolio, con amplias extensiones en el Sur y en el Este de bosque tropical perennifolio. Su clima es tropical. Las floraciones suceden desde noviembre hasta junio o julio. Es la región productora de miel más importante del país, se cosechan 20,553 toneladas de miel al año con un rendimiento promedio por colmena de 41 Kg, lo que representa la mayor producción en la menor superficie. Cuenta con 497,810 colmenas explotadas por 18, 039 apicultores. Las colmenas rústicas prácticamente se desconocen y se utilizan las de tipo técnico Langstroth.

A nivel mundial la Península de Yucatán es una región importante productora de miel, ya que el 95% de su producción se destina al mercado internacional, siendo considerado uno de los primeros exportadores y productores de gran calidad en Europa y Estados Unidos (Correa y Guzmán, 2006).



**Figura 3.** Zonas apícolas en la República Mexicana

## 2.6 COMPOSICIÓN DE LA MIEL

La composición de la miel se encuentra en un cambio constante durante todo el proceso de elaboración. La invertasa convierte la sacarosa en fructosa y glucosa. La dextrasa también puede ser convertida en azúcares más complejos y por lo tanto estar cambiando el balance de azúcares en la miel (Voidarou et al., 2011). Los factores que le confieren características organolépticas y nutricionales únicas a cada miel principalmente son el origen botánico, área geográfica, tecnología utilizada al momento de la extracción y condiciones de almacenamiento (Soares et al., 2015).

La miel está compuesta aproximadamente de 181 componentes. Contiene principalmente azúcares (Cuadro 2) como fructosa (18.4%), glucosa (30.3%), sacarosa (1.3%) y otros carbohidratos (12%). También contiene minerales (0.169%), proteínas (169 mg/100g), un contenido de agua de aproximadamente 17.2% (Voidarou et al., 2011) y una acidez total de aproximadamente 0.08%, además de compuestos minoritarios como cenizas (0.18%), enzima glucosa-oxidasa y catalasa, ácido ascórbico, carotenoides, ácidos orgánicos, aminoácidos, tocoferoles, ácidos fenólicos y flavonoides. Algunos aspectos y

compuestos funcionan como antibacterianos, antioxidantes, antitumorales, antiinflamatorios y antivirales (Pozo y Michelle, 2016).

**Cuadro 2.** Carbohidratos presentes en la miel (Ulloa et al., 2010).

Monosacáridos	Disacáridos	Trisacáridos	Sacáridos complejos
Fructosa Glucosa	Sacarosa Gentibiosa Isomaltosa Maltosa Maltulosa Nigerosa Palatinosa Turalosa	Centosa Eriosa Isomaltotriosa Isopanosa Laminaritriosa Maltotriosa Melezitosa Panosa	Isomaltopentosa Isomaltotetraosa

### 2.6.1 AGUA

El agua es el segundo componente más importante de la miel y su contenido depende de varios factores ambientales durante su producción tal como el clima y la humedad dentro de las colmenas, pero también depende de las condiciones del néctar y el tratamiento de la miel durante su extracción y almacenamiento (Olaitan et al., 2007). Normalmente, una miel madura tiene un contenido de humedad por debajo del 18.5%. Cuando se excede este porcentaje de humedad, la miel es susceptible a fermentar, principalmente cuando la cantidad de levaduras osmofílicas es alta. El contenido de agua en la miel influye en su peso específico, viscosidad y color. Así como también es una gran influencia para la conservación y cualidades organolépticas de la miel (Ulloa et al., 2010). Los valores de Aw (actividad de agua) de la miel de abeja se encuentran entre 0.56 y 0.62, valor que impide el crecimiento de casi cualquier microorganismo con excepción de algunas levaduras y bacterias osmofílicas (Coll et al., 2008).

### 2.6.2 ENZIMAS

Las enzimas son añadidas principalmente por las abejas, esto con el fin de lograr el proceso de maduración del néctar a miel y éstas son en gran parte las responsables de la complejidad composicional de la miel (Ulloa et al., 2010). Las principales enzimas encontradas en la miel que son derivadas de las glándulas hipofaríngeas de las abejas obreras son la invertasa o sacarasa,

también conocida como  $\beta$ -fructofuranosidasa (cataliza la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa), la glucosa oxidasa (oxida la glucosa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno en presencia de agua) y la amilasa, la cual se encarga de descomponer el almidón (Torres et al., 2008).

### **2.6.3 PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS**

La miel contiene aproximadamente 0.5% de proteínas, principalmente como enzimas y aminoácidos. Los niveles de aminoácidos y proteína en la miel son el reflejo del contenido de nitrógeno, el cual es variable pero no supera el 0.04%. Entre el 40-80% del nitrógeno total de la miel es proteína.

La presencia de proteínas en la miel resulta en una baja tensión superficial, lo que fomenta la formación de las finas burbujas de aire en una marcada tendencia al espumado. La cantidad de aminoácidos libres en la miel es pequeña y no tiene importancia nutricional. En la miel se han encontrado entre 11 y 21 aminoácidos libres, de los cuales la prolina representa alrededor de la mitad del total. Además de la prolina, el ácido glutámico, alanina, fenilalanina, tirosina, leucina e isoleucina se presentan en niveles mayores. Los aminoácidos reaccionan con algunos de los azúcares para producir sustancias amarillas o cafés responsables del oscurecimiento de la miel durante su almacenamiento (Ulloa et al., 2010).

### **2.7 PROBLEMÁTICA DE BACTERIAS RESISTENTES**

Los antibióticos fueron la solución de las infecciones bactericidas, sin embargo, su eficiencia ha disminuido con el tiempo debido al abuso y uso excesivo de estas. Últimamente, se ha reportado un incremento de infecciones causadas por cepas resistentes. La producción de nuevos antibióticos requiere una gran inversión económica, es por eso que para tratar esta problemática están siendo reconsideradas las sustancias naturales como los productos que provienen de colmenas, entre ellos la miel, estos productos han sido conocidos a lo largo de la historia como productos no tóxicos y son unos antimicrobianos eficientes con un alto espectro de acción (Aggad y Guemour, 2014). La miel ha sido usada para tratar infecciones como úlceras, úlceras por presión, heridas causadas por quemaduras, lesiones y heridas quirúrgicas (Libonatti et al., 2014). Ya que se

sabe que la miel tiene estos beneficios, esta ha sido de gran interés para profesionales médicos e investigadores científicos.

## **2.8 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MIEL**

Las propiedades antibacterianas de la miel son conocidas desde hace siglos. La miel se utilizaba para tratar heridas infectadas 2000 años antes de que se descubriera que las bacterias eran la causa de estas infecciones. Se ha reportado que tiene un efecto inhibitorio en más de 60 especies de bacterias incluyendo bacterias aerobias y anaerobias, Gram positivas y Gram negativas (Schencke et al., 2016). También se ha reportado un efecto antifúngico en algunas levaduras y especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. A pesar de que la miel muestra propiedades antibacterianas, en esta se encuentran bacterias del género *Bacillus*, que se presentan en estado esporulado. Son microorganismos que no tienen un efecto negativo sobre la miel y no son peligrosos para la salud humana. Pueden llegarse a encontrar algunos patógenos para las abejas, como *Bacillus larvae* y *Bacillus alvei*. También pueden estar presentes algunos mohos del género *Penicillium* y *Mucor* debido a que las flores se enriquecen de levaduras durante la polinización; cuando las flores están en zonas donde existen frutos en descomposición también se pueden encontrar levaduras en la miel del género *Saccharomyces* y son las principales responsables de la fermentación de la miel cuando el porcentaje de humedad es cercano al 21% (Coll et al., 2008). Se ha encontrado que en ciertos casos la miel ha mostrado tener actividad antibacteriana donde los antibióticos no fueron efectivos. La miel pura tiene un efecto bactericida sobre muchos microorganismos patógenos como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., y otras bacterias enteropatógenas como *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y otros organismos Gram positivos y Gram negativos (Olaitan et al., 2007), sin embargo, no todas las mieles tienen la misma actividad antibacteriana ya que varios factores dependen de ella como su osmolaridad, su pH, su actividad por peróxido de hidrógeno, compuestos fenólicos y otros factores no descritos (Vorlova et al., 2005). También hay otros compuestos que no han sido muy estudiados como el compuesto metilglioxal y el péptido antimicrobiano llamado defensin-1 (Kwakman et al., 2010). La cantidad presente de estos componentes en la miel dependen de factores como la fuente floral utilizada para recolectar el néctar

por las abejas, el origen geográfico, el clima, el proceso, la manipulación y el almacenamiento (Silici et al., 2010).

La actividad antibacteriana de la miel es atribuida a dos tipos de factores. Los primeros son los factores físicos como la acidez y la osmolaridad; y los segundos son los factores químicos como el peróxido de hidrógeno, compuestos no peróxidos, compuestos volátiles, néctar, propóleo y polen.

La acidez de la miel es influenciada por los ácidos orgánicos y la concentración de sustancias minerales (Vorlova et al., 2005). Los ácidos orgánicos constituyen un 0.57% de la miel, incluyen el ácido glucónico el cual es un subproducto de la digestión enzimática de la glucosa. Los minerales se encuentran presentes en cantidades muy bajas (0.17%), siendo el potasio el más abundante. Otros minerales presentes son el calcio, cobre, hierro, magnesio y el fósforo. Normalmente, el pH de la miel se encuentra entre 3.2 y 4.5, el cual es suficientemente bajo para ser inhibidor de muchos patógenos (Olaitan et al., 2007).

El efecto osmótico se debe a que la miel es una solución sobresaturada de azúcares, donde el 84% son una mezcla de glucosa y fructosa, esto crea una alta presión osmótica la cual es desfavorable para el crecimiento y proliferación de las bacterias. La fuerte interacción de estas moléculas de azúcar dejará muy pocas moléculas de agua disponibles para los microorganismos (Aggad y Guemour, 2014; Olaitan et al., 2007).

La actividad antimicrobiana de la miel se atribuye principalmente al peróxido de hidrógeno el cual es producido enzimáticamente por la glucosa oxidasa que se origina de las glándulas hipofaríngeas de las abejas melíferas; por lo tanto entre mayor sea el nivel de glucosa oxidasa mayor será el nivel de peróxido de hidrógeno, esta concentración varía dependiendo de la salud y la dieta de la abeja. Sin embargo, la cantidad de peróxido de hidrógeno no solo está determinado por los niveles de glucosidasa ya que la miel también puede contener catalasas, peroxidases y antioxidantes como el ácido galico y ácido cafeico. La concentración también se ve afectada por varios factores como la



luz, temperatura y oxígeno, las cuales van variando del proceso y condiciones de almacenamiento de la miel (Libonatti et al., 2014). Los factores no peróxidos también contribuyen a las propiedades antimicrobianas de la miel, como la lisozima, los ácidos fenólicos y los flavonoides. Algunos compuestos fenólicos son característicos de la miel unifloral y principalmente los flavonoides que se producen en el néctar a medida que los glucósidos se hidrolizan y son transferidos a la miel (Silici et al., 2010). Los compuestos no peróxidos son estables al calor, a la luz y a la miel diluida (Olaitan et al., 2007). Su actividad antibacteriana de los compuestos no peróxidos está asociada con una alta concentración de azúcares y la presencia de compuestos antioxidantes y proteínicos (Truchado et al., 2009).

Los flavonoides como los ácidos benzoicos y cinámicos también contribuyen a la actividad antibacteriana pero de manera muy pequeña a comparación de la contribución del peróxido de hidrógeno (Silici et al., 2010), estos se derivan del própolis, un material resinoso recolectado por las abejas de la goma de los exudados de los árboles y es utilizado como agente antibacteriano en urticarias. Los antioxidantes fenólicos son conocidos por inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas y Gram positivas (Taormina et al., 2001).

Otro factor que influye en la actividad antimicrobiana de la miel es la baja actividad de agua que contiene la miel. Los valores de  $A_w$  de miel de abeja se encuentran entre 0.56 y 0.62, valor que impide el crecimiento de casi cualquier microorganismo con excepción de algunas levaduras y bacterias osmofílicas. Sin embargo si la miel es diluida, el  $A_w$  alcanzado ya no sería efectivo para inhibir el crecimiento de los microorganismos (Coll et al., 2008).

## 2.9 BACTERIAS DE IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA ALIMENTICIA

### 2.9.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram positiva, cuyo diámetro se encuentra entre 0.5 y 1.5  $\mu\text{m}$ , se divide en agrupaciones que asemejan racimos de uva, son bacterias no móviles y son anaerobias facultativas. Hasta la fecha se han reportado 35 especies conocidas con 17 subespecies en el género *Staphylococcus*, posee características particulares de virulencia y resistencia contra antibióticos, lo cual es un grave problema de salud ya que se extiende a nivel mundial y el impacto en la morbi-mortalidad es considerable a nivel comunitario e intrahospitalario. Tiene una gran capacidad de adaptación por lo que afecta a todas las especies conocidas de mamíferos, es por eso que se puede transmitir de una especie a otra (Borraz, 2006; Zendejas et al., 2014).

La patogenicidad de las infecciones por *Staphylococcus aureus* se relaciona con diversos componentes de la superficie bacteriana; de manera general se compone de peptidoglicanos y ácidos teicoicos, además de la proteína A. La patogenia provocada por este microorganismo surge cuando se produce la combinación de los factores de virulencia con la disminución de las defensas del huésped, propiciando que posea características de virulencia y daños bastantes particulares, llegando a convertirse en una de las bacterias más importantes en la clínica y en las enfermedades transmitidas por alimentos. El patógeno ha ido desarrollando múltiple resistencia contra los antibióticos, propiciando que cada vez sea mucho más difícil el tratamiento y la curación de las enfermedades ocasionadas por esta bacteria (Osés et al., 2016; Zendejas et al., 2014).

*Staphylococcus aureus* es una de las principales bacterias implicadas en las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) debido a que es capaz de producir componentes superficiales como toxinas y enzimas extracelulares. Las toxinas se dividen de acuerdo con los efectos biológicos que producen en las células así como con su localización dentro de la célula bacteriana (Cuadro 3). Una de las toxinas que normalmente se encuentra implicada en los brotes de intoxicación alimentaria es la enterotoxina A, ya que es demasiado potente y

con una cantidad de 100 ng es suficiente para causar síntomas de intoxicación (Zendejas et al., 2014).

**Cuadro 3.** *Staphylococcus aureus*: toxinas y efectos biológicos (Zendejas et al., 2014).

<b>Toxinas</b>	<b>Efecto biológico</b>
<b>Citotoxinas (<math>\alpha</math>, <math>\beta</math>, <math>\delta</math> y <math>\gamma</math> leucocidina de PV)</b>	Mecanismo poro-perforador sobre las membranas de leucocitos, eritrocitos, macrófagos, plaquetas y fibroblastos
<b>Toxina exfoliativa (ETA y ETB)</b>	Proteasas, que rompen los puentes intercelulares en el estrato granuloso de la epidermis.
<b>Enterotoxinas (A-E, G-I)</b>	Superantígenos (estimula la proliferación de células T y la liberación de citosinas): estimula la liberación de mediadores químicos de los mastocitos, aumentando el peristaltismo.
<b>Toxina del síndrome del choque tóxico TSST-1</b>	Super antígenos (estimulan la proliferación de células T y la liberación de citosinas); produce extravasación o la destrucción de las células endoteliales

La contaminación de *Staphylococcus aureus* se da principalmente por el contacto del alimento con los manipuladores, es decir, aquellas personas que tienen contacto directo con los alimentos durante su preparación, envasado, almacenamiento, transporte, distribución, venta, suministro y/o servicio (Tortora et al., 2007). De aquí la importancia de tener un buen control sanitario durante todo el proceso de los alimentos. Debido a que los agentes patógenos potenciales se encuentran en diversos ambientes como lugares con presión osmótica elevada y la humedad reducida, estos pueden sobrevivir y desarrollarse en las secreciones nasales del portador, aunque también se encuentra presente en heridas infectadas, quemaduras, tracto urogenital, gastrointestinal y casi en cualquier secreción corporal, es por eso que aproximadamente la totalidad de la población humana podría ser portadora del microorganismo en algún momento de su vida (Zendejas et al., 2014). *S. aureus* puede contaminar cualquier sitio de la piel o mucosas o a otras personas por transferencia interpersonal, a través de aerosoles o por contacto

directo. Las mucosas de la piel ofrecen una barrera mecánica que evita la invasión local de los tejidos. Si esta barrera se rompe por causa de un traumatismo o de cirugía, la bacteria puede llegar a sobrepasar los mecanismos fagocíticos locales y acceder a los canales linfáticos y al torrente sanguíneo, dando origen a una bacteriemia estafilocócica, complicación severa que puede conducir a una infección metastásica y de mal pronóstico (Cervantes et al., 2014).

La mayoría de los brotes son originados por *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, ya que muy pocas cepas coagulasa negativa son capaces de producir enterotoxinas (intoxicación alimentaria estafilocócica, IAE). Las enterotoxinas estafilocócicas son de las pocas toxinas bacterianas de naturaleza proteica, que presentan termorresistencia. Esto explica por qué las IAE son relativamente comunes, ya que las toxinas no se destruyen tan fácilmente. Se sabe que los alimentos más susceptibles son aquellos que tienen contacto con la piel del animal, tal como la leche, el huevo, los productos cárnicos como el jamón e incluso la carne de pollo; este último es muy susceptible debido a que tiene características fisicoquímicas que permiten que su superficie se contamine fácilmente, especialmente en la etapa de evisceración. También el chorizo es ideal para la proliferación de *Staphylococcus aureus* ya que las materias primas con las que se elabora, de las que destacan la carne y la tripa tienen excesiva manipulación por parte del productor. Otro factor importante para la proliferación de *S. aureus* es la temperatura inadecuada a la que se expenden los productos o se almacenan las materias de elaboración (Zendejas et al., 2014).

Los síntomas que presenta una persona que ha sido afectada por una intoxicación alimentaria por *S. aureus* abarca náuseas, dolor abdominal, emesis, diarrea y postración, en casos más graves se puede presentar cefalea. La intensidad de los síntomas depende de la cantidad de alimento contaminado ingerido, de la concentración de la toxina y la susceptibilidad individual, la cual está mediada por la edad y por el estado inmunológico de la persona (Zendejas et al., 2014).

De acuerdo con el Programa de Vigilancia Antimicrobiana, los cuales examinaron más de 81,000 casos aislados durante el período 1997-2002, se demostró que *S. aureus* fue la causa más común de bacteriemia nosocomial en América del Norte, con una prevalencia de 26.0% y en América Latina con 21.6% fue también la segunda causa más común de bacteriemia nosocomial en Europa con una prevalencia de 19.5%. En México, la situación de infecciones ocasionadas por *S. aureus* es desconocida, ya que no existe un registro referente al número de casos asociados que atenten contra la vida del paciente (Naber, 2009).

Debido a la importancia de esta bacteria, *S. aureus* es de las bacterias más utilizadas para medir la actividad antibacteriana de la miel, esto es debido a que es capaz de tolerar alto contenido de azúcares y niveles elevados de acidez, aunque es sensible a la acción antibacteriana del peróxido de hidrógeno y a la acción inhibitoria de los compuestos no peróxidos de la miel (Osés et al., 2016).

### **2.9.2 *Salmonella* Typhimurium**

Los microorganismos del género *Salmonella* pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, su tamaño oscila de 0.3 a 1  $\mu\text{m}$  x 1.0 a 6.0  $\mu\text{m}$ , son móviles debido a la presencia de flagelos peritricos a excepción de *S. gallinarum* y *S. pullorum*; poseen un metabolismo oxidativo y fermentativo. Producen ácido y a menudo gas durante la fermentación de la glucosa u otros hidratos de carbono (Parra et al., 2002). Hasta la fecha se han identificado más de 2500 serotipos diferentes en dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. Siendo *Salmonella enterica* serotipo *enteritidis* y *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, los dos serotipos más importantes de *Salmonella* transmitida de animales a seres humanos en la mayor parte del mundo (OMS, 2018b). Aproximadamente el 15% de los casos de salmonellosis enterica en ciudades son originadas por ingestión de productos derivados del cerdo, carne infectada, pollo, leche cruda y huevo. Por eso es de gran importancia encontrar un producto antibacteriano que sea capaz de inhibir a *Salmonella* (Miarelli et al., 2016; Parra et al., 2002)

*Salmonella* Typhimurium es capaz de colonizar el tracto intestinal inferior de una amplia gama de animales, incluidos los humanos debido a que el microorganismo es capaz de crecer en diferentes ambientes. Es responsable de la zoonosis agudas transmitidas por los alimentos en todo el mundo, así como de numerosos casos de gastroenteritis y bacteriemia anualmente. La mayoría de los casos en humanos son causados por alimentos de origen animal. Los cerdos son los principales portadores asintomáticos de *S. Typhimurium* (Miarelli et al., 2016).

*S. Typhimurium* interactúa con el animal hospedero, enfocándose principalmente a factores que permitan romper sus barreras y de manipular las células del hospedero para un beneficio propio. Es capaz de causar diferentes enfermedades que van desde gastroenteritis hasta una infección sistémica. *S. Typhimurium* es capaz de vivir como comensal, es decir, puede permanecer en el intestino del hospedero sin causar síntomas. En el Cuadro 4 se muestran los tipos de infecciones que puede causar *S. Typhimurium* (Herrero y Olsen, 2018).

**Cuadro 4.** Tipos de infecciones causados por *Salmonella* Typhimurium (Herrero y Olsen, 2018).

<b>Tipos de infección</b>	<b>Síntomas clínicos</b>
<b>Enfermedad diarreica (Colitis)</b>	Gastroenteritis autolimitada “Salmonellosis”. Colitis con ulceraciones. Fiebre, calambres, dolor abdominal y diarrea con o sin sangre, náuseas y vómitos
<b>Enfermedad invasiva</b>	Propagación más allá del intestino: infección invasiva (Bacteriemia y sepsis e infección focal, meningitis, artritis, séptica, osteomielitis, colangitis y neumonía)
<b>Fiebre tifoidea y paratifoidea (Fiebre entérica)</b>	Enfermedad sistémica invasiva. Fiebre, dolor de cabeza, dolor abdominal, diarrea transitoria o estreñimiento. La infección puede producir una perforación intestinal fatal que podría conducir a una septicemia.
<b>Infección crónica</b>	Transporte permanente de las bacterias en órganos específicos: intestino, ganglios linfáticos mesentéricos, vesícula biliar. Asintomático.

En Estados Unidos, *Salmonella* ha provocado aproximadamente 1.2 millones de enfermedades, 23,000 hospitalizaciones y 450 muertes por año. De las

cuales se estima que los alimentos fueron la fuente de 1 millón de enfermedades, 19,000 hospitalizaciones y 380 muertes (CDC, 2019).

### **2.9.3 *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* es una bacteria Gram positiva anaerobia facultativa, que causa infecciones en el hombre y los animales; es capaz de sobrevivir en medios inanimados, adaptándose rápida y eficazmente a cambios extremos de condiciones ambientales, ya que es relativamente resistente a la refrigeración, a la sequedad y al calor extremo, tolera un pH de 3.6 - 9.5 y altas concentraciones de cloruro sódico. La falta de medidas de control en el proceso de los alimentos puede crear una ruta de contaminación, principalmente en la industria de los alimentos listos para el consumo ya que no existe un calentamiento ni otro proceso antimicrobiano entre la etapa de producción y de consumo (Kieran y Olivia, 2018). *Listeria monocytogenes* se encuentra principalmente en el suelo, el forraje, el agua, los silos y el tracto gastrointestinal de aves, peces y mamíferos, incluido el hombre. La mayoría de las infecciones se asocian con la ingestión de carne, pescado, vegetales crudos, lácteos no pasteurizados, quesos, embutidos, helados y en general productos refrigerados sin cocción previa al consumo (Artola y Herrejón, 2010).

*L. monocytogenes* provoca listeriosis, una enfermedad transmitida por alimentos con un rango de mortalidad entre el 20% y 30% (Kieran y Olivia, 2018), sus síntomas más comunes son: fiebre, dolor muscular, serios problemas gastrointestinales, también puede llegar al sistema nervioso y causar dolor de cabeza, confusión y pérdida del equilibrio (Kljujev et al., 2018). Las personas mas susceptibles a adquirir listeriosis son aquellas con el sistema inmunológico comprometido como adultos mayores, recién nacidos y mujeres embarazadas (Buchanan et al., 2017).

La sobrevivencia y el crecimiento de *L. monocytogenes* en los alimentos depende de factores intrínsecos del alimento como la actividad del agua y el pH; y de factores extrínsecos como la humedad relativa, temperatura de almacenamiento y el material de empaque (Kieran y Olivia, 2018).

#### **2.9.4 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, móvil, reductor de nitritos, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae* y se encuentran descritos seis grupos de *E. coli*: la productora de diarrea: enteropatógena (EPEC), la enterohemorrágica (EHEC), la enterotoxigénica (ETEC), la enteroagregativa (EAEC), la enteroinvasiva (EIEC) y la de adherencia difusa (DAEC) (Rodríguez, 2002). *E. coli* predomina en la flora intestinal de los humanos y coloniza el tracto gastrointestinal de los infantes a unas horas después del nacimiento. Se considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas productoras de la toxina Shiga, las cuales pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos como diarrea, síndrome urémico hemolítico, colitis hemorrágica y cuadros de disentería, principalmente en niños (Rodríguez, 2002). *E. coli* normalmente se encuentra como un microorganismo comensal en el tracto gastrointestinal, normalmente sin síntomas, pero en caso de que el huésped se encuentre con defensas bajas o las barreras gastrointestinales sean violadas, causará infección (Jure et al., 2010; Nataro y Kaper, 1998).

*E. coli* se transmite principalmente por el consumo de alimentos contaminados, como productos de carne picada cruda o poco cocida, leche y jugos sin pasteurizar, quesos realizados con leche bronca, agua, frutas y verduras contaminadas con material fecal. Existen brotes asociados al consumo de frutas y verduras contaminadas por el contacto con las heces de animales domésticos o salvajes en algún momento durante su cultivo o su manipulación (OMS, 2018a). En el 2008 en Estados Unidos se reportaron 214 hospitalizaciones provocadas por *E. coli*, productora de la toxina Shiga (CDC, 2008).

##### **2.9.4.1 *Escherichia coli* enteropatógena**

*Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad. Este patógeno es una causa importante de diarrea fatal en infantes menores de 6 meses a 2 años, con un 50% de mortalidad. También puede aislarse en adultos enfermos y sanos



principalmente cuando hay un factor predisponente como diabetes. La forma de transmisión de EPEC es fecal-oral por manos contaminadas de manipuladores de alimentos. El cuadro clínico que produce este patógeno se manifiesta con diarrea aguda, la cual puede ser leve o grave, con vómito, fiebre baja y mala absorción (Rodríguez, 2002). En ciudades desarrolladas la diarrea causada por EPEC ya no es tan importante como en los años 1940 y 1950. Los casos más recientes se han reportado en Estados Unidos, Inglaterra y Finlandia, estos brotes han tenido origen en guarderías infantiles y en salas pediátricas. También han existido brotes en adultos, uno de los casos más recientes se dio en un buffet gourmet de Minnesota. En cambio en países en desarrollo EPEC es la causa principal de diarrea en infantes, afectando principalmente a infantes entre 0-6 meses de nacidos. Estudios realizados en Brasil, México y África muestran que de los niños que sufren de diarrea del 30% al 40% son causados por EPEC (Nataro y Kaper, 1998).

#### **2.9.4.2 *Escherichia coli* enterotoxigénica**

*Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) es importante para lactantes, principalmente los niños menores a dos años y en particular durante los primeros 6 meses de vida. En niños de edad escolar y en adultos puede ser asintomática y poco frecuente; también puede producir la diarrea del viajero, incluso en animales. Los síntomas que provoca ETEC puede ser diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en algunos casos puede presentar fiebre y vómito (Rodríguez, 2002). ETEC coloniza la superficie de la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias, siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxinas termolábiles y toxinas termoestables, lo cual incrementa la secreción intestinal (Nataro y Kaper, 1998). La principal fuente de infección es la contaminación fecal de agua y alimentos, siendo la dosis efectiva de  $1 \times 10^8$  UFC (Rodríguez, 2002).

### **3. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN**

#### **3.1 Objetivo general**

Determinar la actividad antibacteriana de mieles producidas por las abejas europeas y meliponas en la República Mexicana.

#### **3.2 Objetivos particulares**

**3.2.1** Determinar la concentración mínima inhibitoria sobre bacterias con importancia en alimentos de mieles producidas en la República Mexicana.

**3.2.2** Determinar la concentración mínima bactericida de mieles producidas en México utilizando como modelo bacterias de importancia en alimentos.

#### **3.3 Justificación**

La aparición de cepas patógenas bacterianas y fúngicas resistentes a antibióticos es una preocupación creciente a nivel mundial debido a la alta morbilidad y mortalidad que se ha observado en los brotes ocasionados por estos organismos. En este sentido la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido una serie de lineamientos para el uso racional de antibióticos y ha propuesto diferentes etapas para el desarrollo de nuevos fármacos que permitan controlar los brotes infecciosos causados por organismos resistentes, es por eso que constantemente incentiva a la comunidad científica para que continúe la búsqueda de nuevas estrategias, ya sea de origen sintético o natural que permitan inhibir estos organismos resistentes (Franco et al., 2013). También, la Organización de las Naciones Unidas señala que la limitación del número de antibióticos y la aparición de cepas resistentes es uno de los tres más grandes retos de la humanidad para este siglo.

Así también, es de gran interés controlar o eliminar el crecimiento de patógenos que transmiten enfermedades por medio de alimentos utilizando antimicrobianos naturales (Taormina et al., 2001). Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se producen por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminados con microorganismos patógenos que afectan la salud

del consumidor en forma individual o colectiva. Los síntomas van desde diarreas y vómitos, hasta un choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, etcétera (Flores y Herrera, 2005).

Las ETA son un problema de salud pública debido al incremento en su ocurrencia y esto es debido al surgimiento de nuevas formas de transmisión, la aparición de grupos poblacionales vulnerables y el aumento de resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos. La incidencia de estas enfermedades es un indicativo de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos, normalmente la contaminación ocurre durante el procesamiento de los alimentos y por el empleo de materia prima contaminada.

La mayoría de las infecciones son ocasionadas por distintas bacterias, virus y parásitos. Entre las bacterias más comunes se encuentran especies de los géneros *Campylobacter*, *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*.

Una de las opciones planteadas para combatir las enfermedades transmitidas por alimentos es el estudio de productos naturales para la identificación de nuevos componentes antimicrobianos. Es por eso que el estudio de la miel es de gran importancia ya que se sabe que varios componentes de ésta, le otorgan una actividad antibacteriana. La posibilidad de usar la miel parece ser muy conveniente, además de que es un tratamiento menos costoso.

#### 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental se muestra de manera general en la Figura 4.

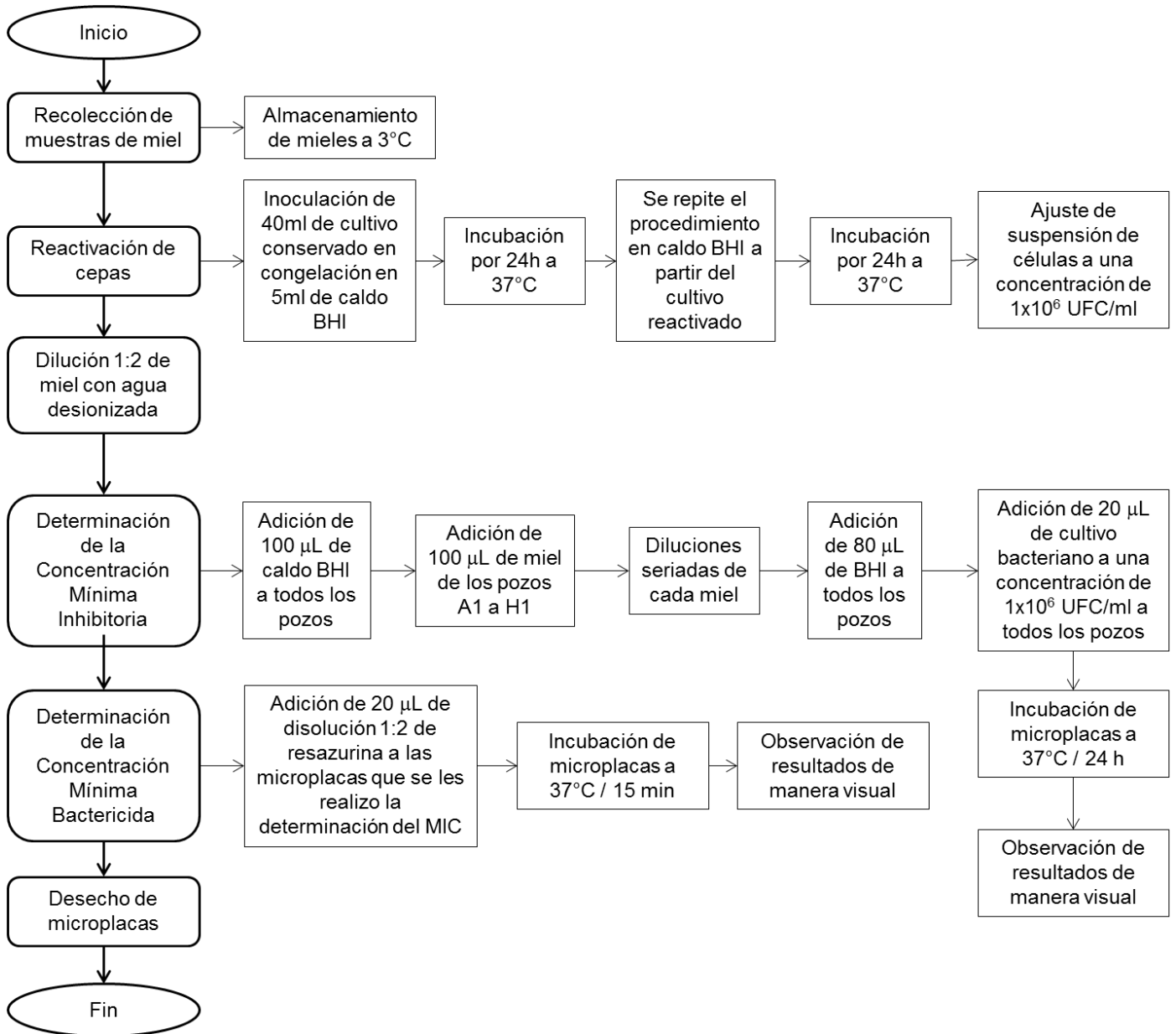


Figura 4. Diagrama del proceso experimental

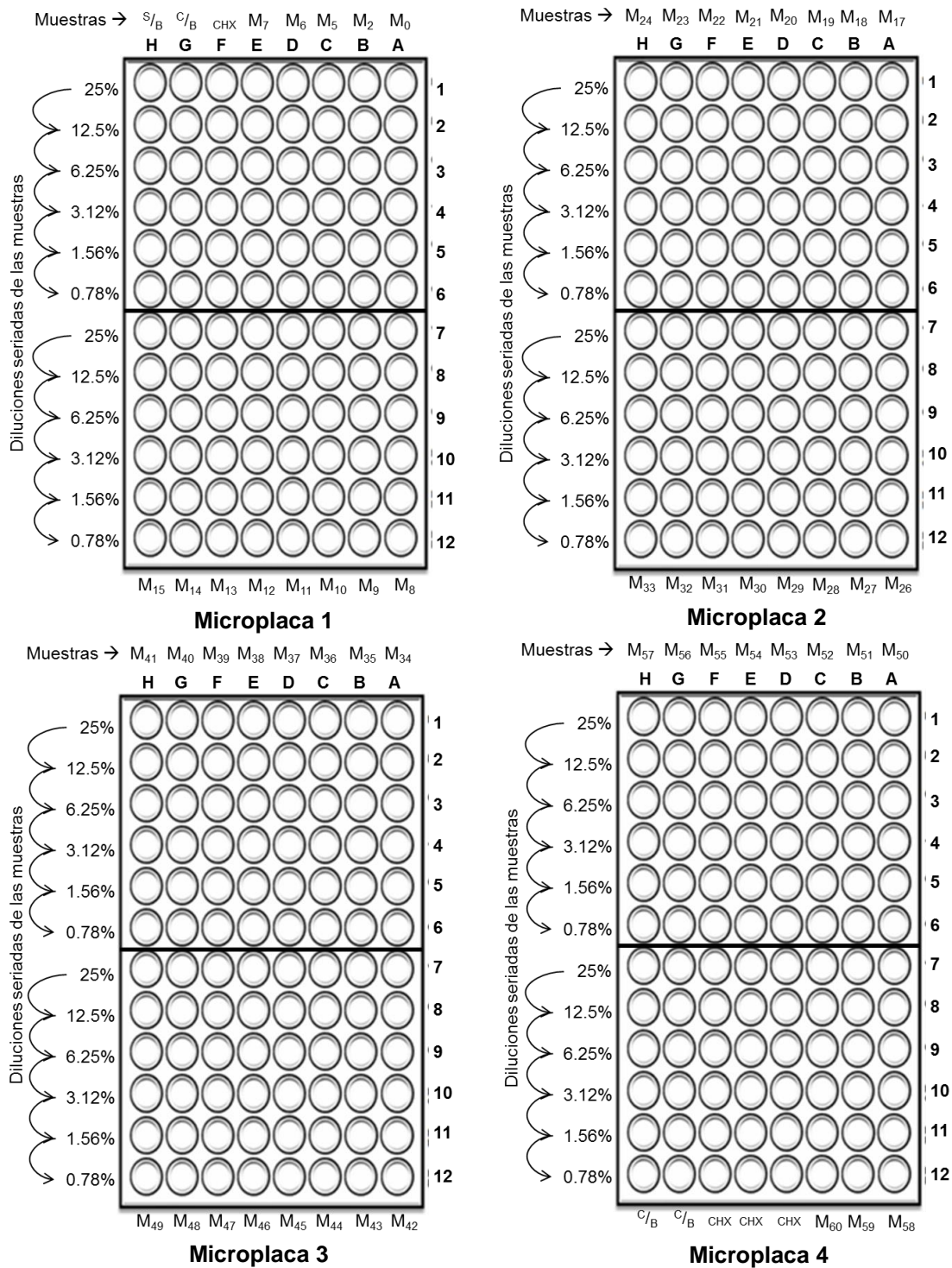
#### 4.1 Recolección

Las muestras de miel se recolectaron en apiarios ubicados en diferentes zonas de México por los investigadores Ángel López Ramírez y Adriana Correa Benítez del Departamento de Medicina y Zootecnia de Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM. Otras muestras fueron proporcionadas por Jaqueline Martínez Gonzáles, María Fernanda Guerrero Pérez de la Facultad de Química de la UNAM y por Jorge Jiménez Díaz de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

#### 4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (MIC) es la concentración mínima de miel necesaria para inhibir completamente el crecimiento bacteriano, es decir, aquella concentración a la cual no se observó crecimiento visible (pozos sin turbidez). La actividad antimicrobiana solo puede detectarse en caso de que el agente antimicrobiano provoque una completa inhibición (Torres et al., 2004). Cada miel se probó por triplicado, como control positivo se utilizó clorhexidina al 5% y como control negativo se inoculó la bacteria en el medio BHI (Merck KgaA), también se elaboró un control para el medio.

La concentración mínima inhibitoria se midió utilizando el método descrito por Manyi-Loh y colaboradores (2010) con modificaciones. Las bacterias de prueba utilizadas fueron *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Listeria monocytogenes* (clave CFQ 103 aislada de un alimento), *Salmonella* Typhimurium (cepa ATCC 14028), *Escherichia coli* (cepa 108412 aislada de un caso de diarrea), *Escherichia coli* EPEC (enteropatógena) (cepa 95222 de pozol), *Escherichia coli* ETEC (enterotoxigénica) (cepa 95238 de pozol). Previamente se realizaron diluciones 1:2 de las mieles con agua desionizada; también se reactivaron las bacterias inoculando 40ml del cultivo conservado en congelación en 5 ml de caldo BHI, se incubó a 37°C por 24h. Se realizó el mismo procedimiento una vez más en caldo BHI a partir del cultivo reactivado y finalmente, las bacterias se cultivaron por 6 horas a 37°C. Se ajustó la suspensión de células utilizando un espectrofotómetro (marca Agilent, modelo 8453E) a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml.



**Figura 5.** Distribución de las muestras en las microplacas de 96 pozos. En todos los pozos se colocaron 100  $\mu$ L de caldo BHI, posteriormente, la fila 1 se le adicionaron 100  $\mu$ L de miel si el pozo indica Mx, de clorhexidina si el pozo indica CHX o de medio BHI si el pozo indica C/B (con bacteria) o S/B (sin bacteria). Se continuó con las diluciones seriadas que indica cada esquema para después añadir 80  $\mu$ L de caldo BHI a todos los pozos y finalmente añadir 20  $\mu$ L de caldo bacteriano a la concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml a todos los pozos con excepción de la columna que indica S/B (sin bacteria).

Para la determinación se utilizaron microplacas estériles de 96 pozos, a los cuales se les añadió 100  $\mu$ L de caldo BHI, posteriormente, se adicionaron 100  $\mu$ L de miel, clorhexidina o medio BHI, dependiendo de si lleva muestra o si son controles positivos o controles negativos (Figura 5). Se continuó con las diluciones seriadas para evaluar las muestras de miel a distintas concentraciones (25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78%), después se añadieron 80  $\mu$ L de caldo BHI a todos los pozos y se añadieron 20  $\mu$ L de caldo bacteriano a la concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml a todos los pozos con excepción de los pozos utilizados como control para el medio de cultivo. Las microplacas se incubaron a 37 °C durante 24 horas para finalmente observar los resultados de manera visible, donde los pozos que presentaron turbidez significan que presentaron crecimiento bacteriano.

#### **4.3 Determinación de la concentración mínima bactericida**

La concentración mínima bactericida (MBC) es la mínima cantidad de miel capaz de destruir el 99.99 % de una muestra inoculada en condiciones estandarizadas. Para esta determinación se utilizan indicadores redox, en este estudio se utilizó resazurina (Sigma Aldrich), su principio se basa en la reducción de la resazurina (Azul, no fluorescente) a resofurina (Rosado, altamente fluorescente), causado por las células metabólicamente activas, más específicamente por oxidoreductasas que se encuentran principalmente en la mitocondria de células viables. El color rosa es directamente proporcional a las células viables. Este colorante es poco tóxico para las células y permite la continuidad de estudios en las mismas células, economizando tiempo y dinero. Por lo tanto si las bacterias fueron inhibidas completamente por la miel, la resazurina debe mantenerse en su forma oxidada y presentar una coloración azul. Se tiene el inconveniente de que la resazurina no es metabolizada por los bacilos Gram negativos no fermentadores (March, 2017).

Las microplacas utilizadas para la determinación de la concentración mínima inhibitoria fueron las que se emplearon para la determinación de la concentración mínima bactericida. A todos los pozos se les añadió 20  $\mu$ L de disolución 1:2 de resazurina (Sigma Aldrich) con medio BHI (Merck KgaA). Las

microplacas se incubaron por 15 minutos a una temperatura de 37 °C, para finalmente observar de manera visual las distintas coloraciones de los pozos. Se reportó como MBC a la mínima concentración de miel que presentó una coloración azul, ya que es la mínima concentración a la cual la miel inhibió el crecimiento bacteriano. En la Figura 4 se resume la metodología que se llevó a cabo para la determinación de los resultados de todas las pruebas realizadas. Los resultados obtenidos se muestran en el anexo 1.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



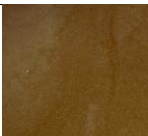
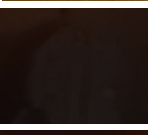

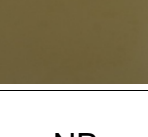


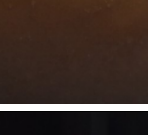


### 5.1 Recolección de muestras

Las muestras recolectadas fueron colocadas en una tabla para poder apreciar con mayor claridad su color, su origen, su estado físico y apariencia, así como ciertas observaciones de algunas muestras de mieles.


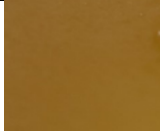
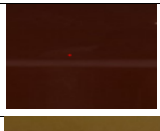

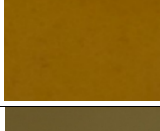
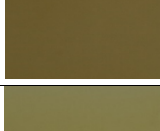
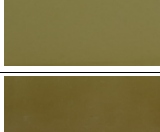
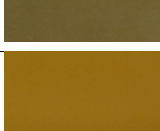
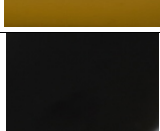

**Cuadro 5.** Origen, color, estado físico, apariencia y observaciones de las muestras de mieles utilizadas para las pruebas del efecto antibacteriano.

MUESTRA	COLOR	ORIGEN	ESTADO FÍSICO/APARIENCIA	OBSERVACIONES
M0		Cuetzalan, Puebla	Líquida, viscosidad baja	Miel Melipona
M1		Coatepec	Líquida, viscosidad media	Miel Melipona
M2		Veracruz	Sólida por cristalización	-
M3	NP	Villahermosa, Tabasco	Líquida con sólidos color café y negro	Miel Melipona
M4		Villahermosa, Tabasco	Líquida con sólidos color café	Miel Melipona Filtrada
M5		Villahermosa, Tabasco	Líquida, sin impurezas, asiento café	Miel Melipona Calentada a 60°C
M6		San Pablo Oztotepec	Sólida por cristalización	-
M7		Acuexcomatl	Líquida, viscosidad alta	Miel multifloral
M8		Chihuahua	Líquida, viscosidad muy alta	Miel de aguacate
M9		San Juan Ixtayopa	Parcialmente sólida por cristalización	Miel de eucalipto

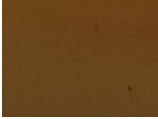


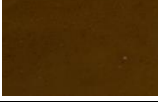
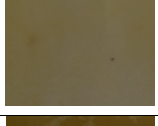
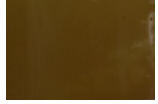

**Cuadro 5 (Continuación).** Origen, color, estado físico, apariencia y observaciones de las muestras de mieles utilizadas para las pruebas del efecto antibacteriano.

<b>MUESTRA</b>	<b>COLOR</b>	<b>ORIGEN</b>	<b>ESTADO FÍSICO/APARIENCIA</b>	<b>OBSERVACIONES</b>
M10		Veracruz	Parcialmente sólida por cristalización	Miel de naranja
M11		Acuexcomatl	Líquida, viscosidad media, dos fases (turbia y transparente)	Miel multifloral
M12		Acuexcomatl	Sólida por cristalización, seco	Miel multifloral
M13		Topilejo Altiplano	Sólida por cristalización	-
M14		Coatepec, Veracruz	Parcialmente sólida por cristalización	-
M15		Zacatecas	Líquida, viscosidad media	Miel de mezquite
M16	NP	Hidalgo, Altiplano	Líquida, viscosidad media	-
M17		Sierra de S.L.P.	Líquida, viscosidad media	-
M18		Veracruz	Líquida, viscosidad muy alta	Miel Melipona comercial
M19		Ciudad Valles, S.L.P.	Líquida, viscosidad media	-
M20		Michoacán	Líquida, viscosidad alta	Miel de aguacate
M21		Veracruz	Parcialmente sólida por cristalización	Miel de naranja


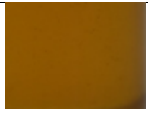





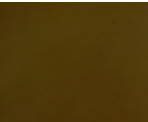
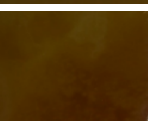
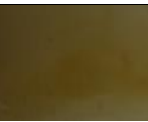
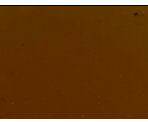
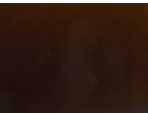
**Cuadro 5 (Continuación).** Origen, color, estado físico, apariencia y observaciones de las muestras de mieles utilizadas para las pruebas del efecto antibacteriano.

MUESTRA	COLOR	ORIGEN	ESTADO FÍSICO/APARIENCIA	OBSERVACIONES
M22		Chontalpa, Tabasco	Parcialmente sólida por cristalización	-
M23		Ciudad Valles, S.L.P	Parcialmente sólida por cristalización	-
M24	NP	Cuetzalán, Puebla	Líquida, viscosidad muy baja	Miel melipona
M25	NP	Cuetzalán, Puebla	Líquida, viscosidad muy baja	-
M26		Milpa Alta	Líquida, viscosidad media	-
M27		Milpa Alta	Sólido por cristalización	-
M28		San Pedro Actopan, Milpa Alta, CDMX	Líquida, Viscosidad Media	Miel multifloral
M29		San Pablo Oztotepec	Sólida por cristalización	-
M30		Milpa Alta	Sólida por cristalización	-
M31		Michoacán	Parcialmente sólida por cristalización	-
M32		Cánada	Líquida	-
M33		Michoacán	Líquida, Viscosidad Alta	Miel de aguacate

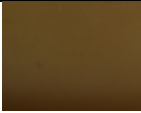
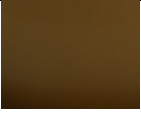

**Cuadro 5 (Continuación).** Origen, color, estado físico, apariencia y observaciones de las muestras de mieles utilizadas para las pruebas del efecto antibacteriano.

<b>MUESTRA</b>	<b>COLOR</b>	<b>ORIGEN</b>	<b>ESTADO FÍSICO/APARIENCIA</b>	<b>OBSERVACIONES</b>
M34		San Pedro Actopan, Milpa Alta, CDMX	Líquida, Viscosidad Alta	-
M35		Cánada	Líquida, con asiento blanquecino	-
M36		San Pedro Actopan, Milpa Alta, CDMX	Sólida por cristalización	-
M37		Huejutla, Hidalgo	Sólida por cristalización	-
M38		Milpa Alta	Líquida	-
M39		Michoacán	Sólida por cristalización	Miel de aguacate
M40		Hidalgo	Sólida por cristalización	Miel multifloral
M41		Milpa Alta, Lucina	Milpa Alta	Miel multifloral
M42		Zacatecas	Parcialmente sólida por cristalización	Miel multifloral de abeja silvestre
M43		San Pedro Actopan, Milpa Alta	Parcialmente sólida por cristalización	-
M44		Tepoztlán, Morelos	Líquida	-
M45		Zacatlán, Puebla	Líquida	-

**Cuadro 5 (Continuación).** Origen, color, estado físico, apariencia y observaciones de las muestras de mieles utilizadas para las pruebas del efecto antibacteriano.

<b>MUESTRA</b>	<b>COLOR</b>	<b>ORIGEN</b>	<b>ESTADO FÍSICO/APARIENCIA</b>	<b>OBSERVACIONES</b>
M46		San Bartolomé Xicomulco, Milpa Alta, CDMX	Parcialmente solida por cristalización	-
M47		Malinalco	Líquida	-
M48		Puebla	Parcialmente sólida por cristalización	-
M49		Zacatecas	Sólida por cristalización	-
M50		Yucatán	Líquida	-
M51		Veracruz	Líquida	-
M52		Michoacán	Líquida	-
M53		Barrio Xaltocan, Xochimilco, CDMX	Parcialmente sólida por cristalización	-
M54		San Mateo, Tlaltenango	Sólida por cristalización	-
M55		San Mateo, Tlaltenango	Sólida por cristalización	-
M56		Xochimilco, CDMX	Líquida	Miel Artesanal
M57		Milpa Alta, CDMX	Sólida por cristalización	-

**Cuadro 5 (Continuación).** Origen, color, estado físico, apariencia y observaciones de las muestras de mieles utilizadas para las pruebas del efecto antibacteriano.

MUESTRA	COLOR	ORIGEN	ESTADO FÍSICO/APARIENCIA	OBSERVACIONES
M58		Milpa Alta, CDMX	Parcialmente sólida por cristalización	Miel comercial multifloral
M59		Milpa Alta, CDMX	Parcialmente sólida por cristalización	-
M60		Milpa Alta, CDMX	Sólida por cristalización	Miel comercial

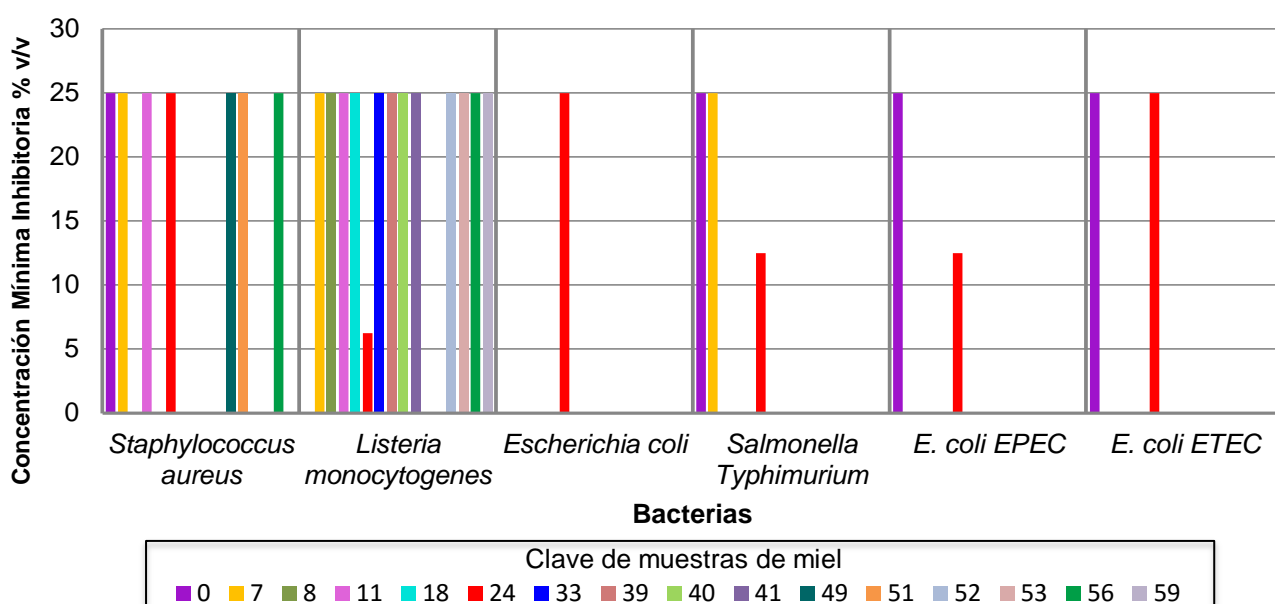
**Nota.** NP: Muestra de miel insuficiente para una muestra de color.

### 5.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Para evaluar la actividad antibacteriana se realizó la determinación de la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida de cada muestra de miel en dilución con seis cepas bacterianas, de las cuales cuatro son Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* enteropatogénica y *Escherichia coli* enterotoxigénica) y dos son Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*). Para este estudio se utilizaron 58 mieles producidas en de la República Mexicana y dos en Canadá. Estas muestras son procedentes de distintos apiarios de las siguientes localidades: Chihuahua, Zacatecas, San Luis Potosí, Hidalgo, Michoacán, Ciudad de México, Puebla, Estado de México, Yucatán, Tabasco y Veracruz. De las 60 muestras de mieles, seis son elaboradas por abejas meliponas (M0, M1, M3, M4, M5 y M24) y 54 mieles son elaboradas por abejas *Apis mellifera*.

En el Cuadros 5 y en la Gráfica 1 se resumen las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) obtenidas para cada miel. Se puede observar que *Staphylococcus aureus* fue inhibida por siete mieles (M0, M7, M11, M24, M49, M51, M56) con una concentración mínima inhibitoria del 25% (p/v). La

inhibición del crecimiento de esta bacteria es relevante debido a que se ha vuelto resistente a la penicilina y a nuevos antibióticos, esto siendo favorecido principalmente por el uso indiscriminado de antibióticos, lo que conlleva a uno de los mayores retos terapéuticos en la actualidad para la medicina (Cervantes et al., 2014). La MIC que se obtuvo para *Staphylococcus aureus* es bastante baja a comparación de un estudio realizado con 33 mieles *Apis mellifera* de la Sierra Nevada de Santa María, Colombia donde no hubo inhibición de *S. aureus* (ATCC 25923) con un MIC menor al 40% (Oliveros et al., 2014). Por otro lado, Minango (2017) recolecto mieles pertenecientes a la ciudad de Ambato provincia de Tungurahua, las cuales presentaron un MIC del 70% y un MBC del 90% para *S. aureus* (ATCC 11632).



**Gráfica 1.** Concentración Mínima Inhibitoria de mieles para seis bacterias patógenas frecuentes en alimentos.

*Listeria monocytogenes* fue inhibida por 13 de las mieles probadas (M7, M8, M11, M18, M24, M33, M39, M40, M41, M52, M53, M56, M59). Estas mieles tuvieron MICs de 25% (p/v) con excepción de la muestra M24, la cual obtuvo un MIC del 6.25% (p/v).

*Salmonella Typhimurium* fue inhibida por las mieles M0, M7 y M24, siendo de nueva cuenta la miel M24 la que presentó la mejor actividad con un MIC de 12.5% (p/v). Por otra parte, *Escherichia coli* enteropatógena fue inhibida por M0 y M24 con una concentración de 25% y 12.5% (p/v), respectivamente;

*Escherichia coli* enterotoxigénica fue inhibida por M0 y M24, ambas con una concentración del 25% (p/v). *Escherichia coli* (cepa 108412 aislada de un caso de diarrea), únicamente fue inhibida por M24 con una concentración del 25% (p/v). Los resultados de *E. coli* fueron mejores que los reportados por Fangio y colaboradores (2007) quienes evaluaron las MIC y las MBC de 30 mieles del sudeste de la provincia de Buenos Aires en concentraciones de 0, 1, 5, 10, 25 y 50% (p/v) y todas presentaron un MIC del 50%, con excepción de una muestra de miel que obtuvo un MIC del 5%, este resultado se le atribuye a la presencia de componentes fitoquímicos en el néctar.

En el Cuadro 6 se comparan las inhibiciones de las seis bacterias usadas como modelo, se puede observar que las bacterias que fueron inhibidas por una mayor cantidad de mieles fueron las Gram positivas, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, en comparación con las bacterias Gram negativas que fueron inhibidas por las mieles M0, M7 y M24. La diferencia en la actividad puede explicarse por la presencia de una membrana externa por parte de las bacterias Gram negativas. Esta barrera contribuye a la resistencia de las bacterias Gram negativas debido a que los canales de porina estrechos disminuyen la penetración de incluso pequeños solutos hidrófilos. Se ha reportado que el 90% de los antibióticos de origen natural que son efectivos en bacterias Gram positivas, no muestran la misma efectividad en *E. coli* (Nikaido, 1996).

En la Gráfica 1 se puede observar que las mieles que presentaron una mayor actividad antibacteriana fueron M0 y M24, seguidas de las muestras M7, M11 y M56. M0 es una miel Melipona proveniente de Cuetzalan, Puebla, M7 y M11 es una miel multifloral y proviene de Acuexcomatl, la muestra M24 es una miel Melipona proveniente de Cuetzalán, Puebla y la miel M56 es de Xochimilco, CDMX. Con base en esta información podemos observar que las mieles con mayor actividad antibacteriana provienen principalmente de dos lugares, Puebla y Acuexcomatl, CDMX.



**Cuadro 6.** Concentración Mínima Inhibitoria (% p/v) de 60 muestras probadas sobre *Staphylococcus aureus* (SA), *Listeria monocytogenes* (LM), *Escherichia coli* (EC), *Salmonella Typhimurium* (ST), *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC).

Muestra	SA	LM	EC	ST	EPEC	ETEC	Muestra	SA	LM	EC	ST	EPEC	ETEC
M0	25%	-	-	25%	25%	25%	M33	-	25%	-	-	-	-
M2	-	-	-	-	-	-	M34	-	-	-	-	-	-
M5	-	-	-	-	-	-	M35	-	-	-	-	-	-
M6	-	-	-	-	-	-	M36	-	-	-	-	-	-
M7	25%	25%	-	25%	-	-	M37	-	-	-	-	-	-
M8	-	25%	-	-	-	-	M38	-	-	-	-	-	-
M9	-	-	-	-	-	-	M39	-	25%	-	-	-	-
M10	-	-	-	-	-	-	M40	-	25%	-	-	-	-
M11	25%	25%	-	-	-	-	M41	-	25%	-	-	-	-
M12	-	-	-	-	-	-	M42	-	-	-	-	-	-
M13	-	-	-	-	-	-	M43	-	-	-	-	-	-
M14	-	-	-	-	-	-	M44	-	-	-	-	-	-
M15	-	-	-	-	-	-	M45	-	-	-	-	-	-
M17	-	-	-	-	-	-	M46	-	-	-	-	-	-
M18	-	25%	-	-	-	-	M47	-	-	-	-	-	-
M19	-	-	-	-	-	-	M48	-	-	-	-	-	-
M20	-	-	-	-	-	-	M49	25%	-	-	-	-	-
M21	-	-	-	-	-	-	M50	-	-	-	-	-	-
M22	-	-	-	-	-	-	M51	25%	-	-	-	-	-
M23	-	-	-	-	-	-	M52	-	25%	-	-	-	-
M24	25%	6.25%	25%	12.5%	12.5%	25%	M53	-	25%	-	-	-	-
M26	-	-	-	-	-	-	M54	-	-	-	-	-	-
M27	-	-	-	-	-	-	M55	-	-	-	-	-	-
M28	-	-	-	-	-	-	M56	25%	25%	-	-	-	-
M29	-	-	-	-	-	-	M57	-	-	-	-	-	-
M30	-	-	-	-	-	-	M58	-	-	-	-	-	-
M31	-	-	-	-	-	-	M59	-	25%	-	-	-	-
M32	-	-	-	-	-	-	M60	-	-	-	-	-	-

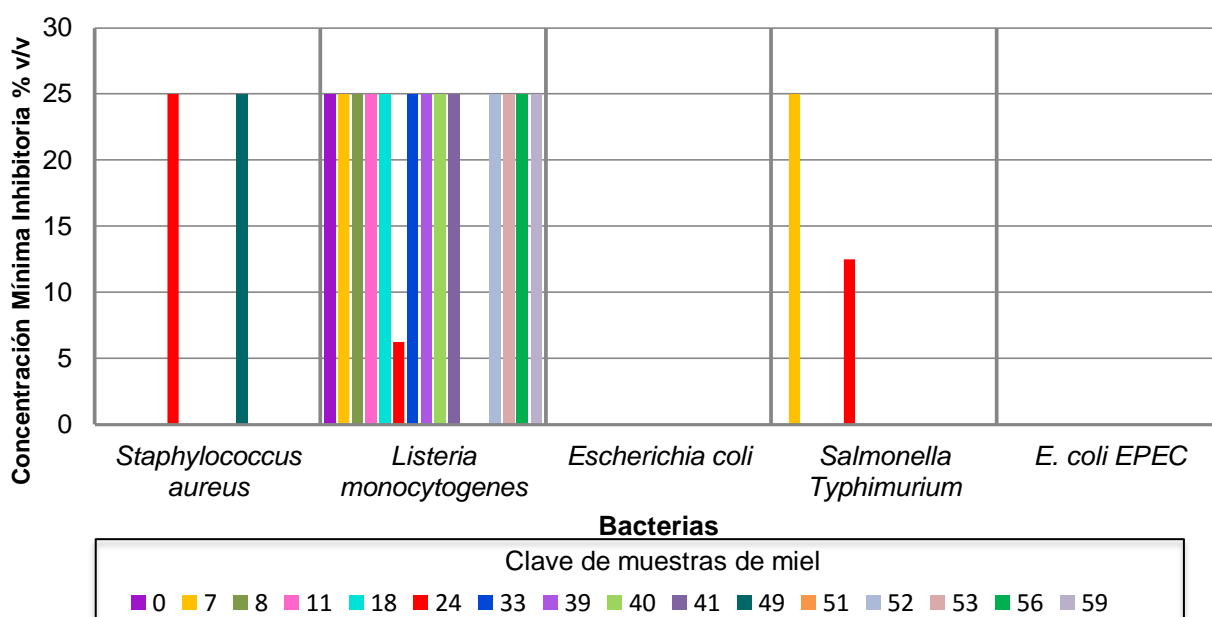
La actividad antibacteriana no depende únicamente del origen de procedencia de la miel, sino que también se ve afectada por otros factores como la fuente floral utilizada para recolectar el néctar por las abejas, clima, proceso, manipulación y almacenamiento de las mieles (Silici et al., 2010). Estos factores varían la osmolaridad, el pH, concentración de peróxido de hidrógeno, concentración de compuestos fenólicos y otros compuestos no descritos en la miel (Vorlova et al., 2005).

Las mieles M24 y M0 son mieles meliponas, es decir, son producidas por abejas sin aguijón. La composición entre la miel producida por abejas con aguijón (*Apis mellifera*) y la producida por abejas sin aguijón (*Meliponini*) no es idéntica, lo cual puede marcar una diferencia en el efecto que presentan sobre diferentes microorganismos. La información existente sobre mieles meliponas es escasa, es por eso que esta miel no está incluida en los estándares internacionales de miel. La miel melipona tiende a tener menor pH debido a que contiene mayor cantidad de ácidos libres, también tiene mayor conductividad eléctrica, mayor concentración de maltosa y nitrógeno, mayor humedad, por lo que suele ser más líquida que las mieles producidas por *Apis mellifera* (Souza et al., 2006). Así mismo, estudios previos indican que la miel de abeja sin aguijón presenta mayor poder inhibitorio para *Staphylococcus aureus* y *S. epidermis* a comparación de la miel de abeja con aguijón. Para las bacterias *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella* Enteritidis y *L. monocytogenes* el comportamiento de ambas mieles es similar (Zamora y Arias, 2011).

La mejor miel es la M24, la cual es la única que inhibió el crecimiento de todas las bacterias y es la miel que obtuvo la menor concentración mínima inhibitoria para *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium y *Escherichia coli* enteropatogénica. Por otra parte, la bacteria más sensible a la miel fue *Listeria monocytogenes*, ya que fue inhibida por 13 mieles. La bacteria menos sensible a la miel fue *Escherichia coli* (cepa 108412 aislada de un caso de diarrea), la cual fue inhibida únicamente por la miel M24.

### 5.3 Determinación de la concentración mínima bactericida

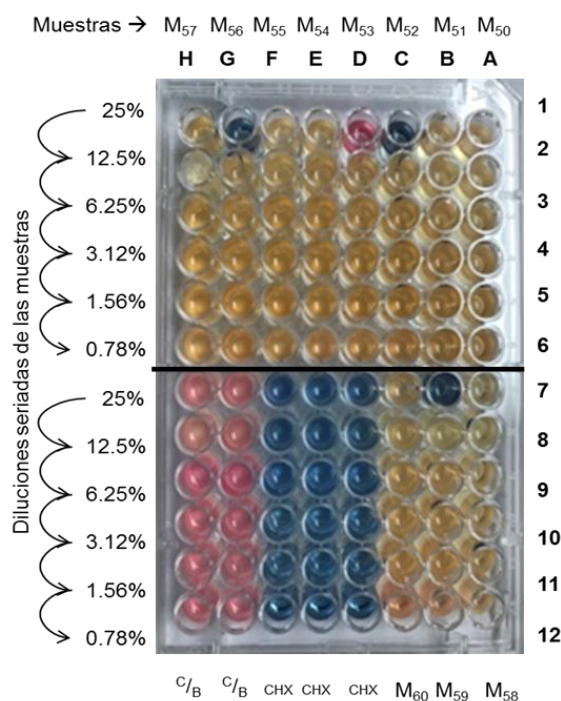
En el Cuadro 7 y en la Gráfica 2 se muestran los resultados de la concentración mínima bactericida (MBC). Los resultados para la MBC únicamente se obtuvieron de manera visible, por lo que la observación de una coloración azul en los pozos significa que las mieles inhibieron completamente a la bacteria. En el caso de *Staphylococcus aureus* para la mayoría de las mieles no se logró determinar la concentración mínima bactericida debido a que las mieles presentaron una coloración rosada o violeta en todas sus concentraciones. La máxima concentración de miel a la cual se le midió MBC fue del 25%, lo que significa que las mieles que no presentaron MBC requieren una concentración de miel superior al 25% para inhibir completamente a *Staphylococcus aureus*. Se puede realizar una comparación entre los MIC's y los MBC's, se espera que ambas concentraciones sean iguales, ya que en ambos casos se determina la concentración a la cual se inhibieron las bacterias. Para el caso de *Staphylococcus aureus* el MIC y el MBC no coinciden, esto es debido a que ambas pruebas se realizaron únicamente de manera visible y para el caso del MIC no se puede apreciar de manera muy específica si existe un crecimiento ligeramente menor al 99.9%, lo que ocasionaría un cambio de color para la prueba de MBC. Las mieles que presentaron un MBC para *Staphylococcus aureus* son las muestras M24 y M49 con una concentración del 25%.



**Gráfica 2.** Concentración Mínima Bactericida de mieles para seis bacterias patógenas frecuentes en alimentos.

Las mieles que inhibieron *Listeria monocytogenes* obtuvieron el mismo MIC y MBC con excepción de la miel M0, la cual no se logró observar la concentración mínima inhibitoria. Las muestras M0, M7, M8, M11, M18, M33, M39, M40, M41, M52, M53, M56 y M59 presentaron una MBC del 25% y la muestra M24 presento una MBC del 6.25%. En la Figura 6 se muestra el ejemplo de una microplaca para la determinación de MBC para *L. monocytogenes*, el resto de las imágenes de las microplacas para todas las bacterias se muestran en el anexo 1.

Las muestras M7 y M24 fueron las únicas mieles que presentaron la misma MBC y MIC para *Salmonella Typhimurium*. Para *Escherichia coli* (cepa 108412 aislada de un caso de diarrea) y *Escherichia coli* enteropatogénica no se logró determinar su MBC. A *Escherichia coli* enterotoxigénica no se le realizó MBC. Kwakman y colaboradores (2010) demuestran que cada bacteria es inhibida por un mecanismo diferente, esta es la importancia de que la miel tenga una actividad antibacteriana multifactorial. La actividad antibacteriana ha sido atribuida a compuestos específicos presentes en la miel, cuya naturaleza y mecanismo de acción no han sido totalmente descritos (Fangio et al., 2007).



**Figura 6.** Ejemplo de microplaca para la determinación de la concentración mínima bactericida para *L. monocytogenes* de las muestras de mieles M50 a M60 con controles positivos (pozos que indican CHX) y controles negativos (pozos que indican C/B).

**Cuadro 7.** Concentración Mínima Bactericida (% p/v) de 60 muestras probadas sobre *Staphylococcus aureus* (SA), *Listeria monocytogenes* (LM), *Escherichia coli* (EC), *Salmonella Typhimurium* (ST), *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC).

Muestra	SA	LM	EC	ST	EPEC	ETEC	Muestra	SA	LM	EC	ST	EPEC	ETEC
M0	-	25%	-	-	-	-	M33	-	25%	-	-	-	-
M2	-	-	-	-	-	-	M34	-	-	-	-	-	-
M5	-	-	-	-	-	-	M35	-	-	-	-	-	-
M6	-	-	-	-	-	-	M36	-	-	-	-	-	-
M7	-	25%	-	25%	-	-	M37	-	-	-	-	-	-
M8	-	25%	-	-	-	-	M38	-	-	-	-	-	-
M9	-	-	-	-	-	-	M39	-	25%	-	-	-	-
M10	-	-	-	-	-	-	M40	-	25%	-	-	-	-
M11	-	25%	-	-	-	-	M41	-	25%	-	-	-	-
M12	-	-	-	-	-	-	M42	-	-	-	-	-	-
M13	-	-	-	-	-	-	M43	-	-	-	-	-	-
M14	-	-	-	-	-	-	M44	-	-	-	-	-	-
M15	-	-	-	-	-	-	M45	-	-	-	-	-	-
M17	-	-	-	-	-	-	M46	-	-	-	-	-	-
M18	-	25%	-	-	-	-	M47	-	-	-	-	-	-
M19	-	-	-	-	-	-	M48	-	-	-	-	-	-
M20	-	-	-	-	-	-	M49	25%	-	-	-	-	-
M21	-	-	-	-	-	-	M50	-	-	-	-	-	-
M22	-	-	-	-	-	-	M51	-	-	-	-	-	-
M23	-	-	-	-	-	-	M52	-	25%	-	-	-	-
M24	25%	6.25%	-	12.5%	-	-	M53	-	25%	-	-	-	-
M26	-	-	-	-	-	-	M54	-	-	-	-	-	-
M27	-	-	-	-	-	-	M55	-	-	-	-	-	-
M28	-	-	-	-	-	-	M56	-	25%	-	-	-	-
M29	-	-	-	-	-	-	M57	-	-	-	-	-	-
M30	-	-	-	-	-	-	M58	-	-	-	-	-	-
M31	-	-	-	-	-	-	M59	-	25%	-	-	-	-
M32	-	-	-	-	-	-	M60	-	-	-	-	-	-

Estudios previos han confirmado que la miel tiene efecto antibacteriano, como es el caso de Basualdo y colaboradores (2007) los cuales describen que la miel producida al sur de la provincia de Córdoba, Argentina con una concentración del 100% inhibe el crecimiento de *Staphylococcus uberis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y de *Klebsiella pneumoniae*, sin embargo, no se encontró actividad antibacteriana a concentraciones de miel menores al 40% (p/v).

Nzeako y Hamdi (2000) realizaron estudios con seis mieles comerciales de Arabia Saudita, estas inhibieron *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* con una concentración del 100%, sin embargo no se obtuvieron los mismos resultados con concentraciones de miel menores al 40% (m/v); Cabrera y colaboradores (2003) también estudiaron la inhibición de las bacterias *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* y *P. aeruginosa* con mieles provenientes del estado de Zulia, Venezuela donde *L. monocytogenes* es la que presenta mayor inhibición y *E. coli*, la bacteria menos afectada. Comparando nuestros resultados con estos trabajos, las mieles M0, M7, M8, M11, M18, M24, M33, M39, M40, M41, M49, M51, M52, M53, M56 y M59 presentan una buena actividad antibacteriana, siendo la más sobresaliente la muestra M24 ya que inhibe todas las bacterias evaluadas y en algunos casos llegando a inhibir con una concentración del 6.25%, el efecto antibacteriano de estas mieles no se debe a su baja actividad de agua debido a que están siendo diluidas.

Para el estudio de cada bacteria se realizaron controles positivos y negativos, además de otro control para el medio BHI, todos los controles salieron de acuerdo a lo esperado, con esto se comprueba que el estudio es confiable. La clorhexidina actúa contra la pared celular de los microorganismos causando alteraciones en la movilidad electroforética de todo el microorganismo, alterando la integridad de la pared celular y facilitando la liberación de los componentes intracelulares. A bajas concentraciones es bacteriostático, las sustancias de bajo peso molecular (K y P) pasan a través de la membrana celular y altas concentraciones es bactericida, produce precipitación del citoplasma (López et al., 2017).

## 6. CONCLUSIONES

- Las muestras de mieles M0, M7, M8, M11, M18, M24, M33, M39, M40, M41, M49, M52, M53, M56 y M59 al 25% presentaron actividad antibacteriana contra las bacterias patógenas evaluadas. Las mieles que presentaron las MIC más bajas fueron las muestras M0, M7 y M24.
- Las mieles probadas tuvieron mejor actividad sobre bacterias Gram positivas, esto puede deberse a que carecen de membrana externa, la cual contribuye a la resistencia.
- La miel M24 que presentó un amplio espectro de actividad antibacteriana, ya que inhibió a todas las bacterias evaluadas y fue la única capaz de inhibir a *Listeria monocytogenes* con un MIC de 6.25%, *Salmonella* Typhimurium y *Escherichia coli* enteropatogénica con un MIC del 12.5%.

## 7. PERSPECTIVAS

- Incrementar el número de muestras de mieles de las distintas regiones de la República Mexicana.
- Determinar el efecto de las mieles recolectadas sobre un panel más amplio de bacterias de importancia en las industrias de alimentos y farmacéutica.
- Determinar el mecanismo mediante el cual las mieles ejercen su actividad antibacteriana.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aggad, H. y Guemour, D., (2014). Honey antibacterial activity. *Med. Aromat. Plants* 3, 152/151-152/152.
- Artola, B. S. y Herrejón, E. P. (2010). Infecciones por *Listeria*. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 10(50), 3368-3372.
- Baquero, L. y Stamatti, G. (2007). Cría y manejo de abejas sin aguijón. Tucumán, Argentina. *Fundación ProYungas, Ediciones del Subtrópico*.
- Basualdo, C., Sgroy, V., Finola, M., Marioli, J. (2007). Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Veterinary Microbiology*, 124, 375-381.
- Borraz, C. O. (2006). Epidemiología de la resistencia a meticilina en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en hospitales españoles. Tesis, para obtener grado de doctor. Universidad de Barcelona.
- Bradbear, N. (2009). Bees and their role in forest livelihoods. A guide to the services provided by bees and the sustainable harvesting, processing and marketing of their products. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 19(9), 81-88.
- Buchanan, R. L., Gorris, L. G., Hayman, M. M., Jackson, T. C., y Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75, 1-13.
- Cabrera L., Ojeda G. R., Céspedes E. y Colina A. (2003). Actividad Antibacteriana de miel de abejas multiflorales (*Apis mellifera scutellata*) de cuatro zonas apícolas del estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 8(3), 205-211.
- Calva, E. (2018). *Salmonella* Typhimurium y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública. *Instituto de Biotecnología, UNAM*. Recuperado de <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap4/>
- CDC, Centers of Disease Control and Prevention. (2008). Los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos son mortalmente graves: ¿Qué puede hacer para evitarlos?. Recuperado en: <https://www.cdc.gov/spanish/Datos/BrotosEnfermedades/>
- CDC, Centers of Disease Control and Prevention. (2019). *Salmonella*. Recuperado en: <https://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>



Cervantes, G. E., García G. R. y Salazar S. P. (2014). General characteristics of *Staphylococcus aureus*. *Revista latinoamericana de patología clínica y medicina de laboratorio*, 61(1), 28-40.

CODEX. (1981). CODEX STAN 12-1981. *Codex Norma Para La Miel*.

Coll, C. F., Villat, C., Laporte, G., Noia, M., y Mestorino, M. (2008). Características microbiológicas de la miel. Revisión bibliográfica. *J. Veterinaria Cuyana*, 3(1).

CONACyT, (2018). Fondo institucional de momento regional para el desarrollo científico, tecnológico y de innovación. Disponible en: <https://www.conacyt.gob.mx/index.php/sni/convocatorias-conacyt/convocatorias-fordecyt/convocatorias-cerradas-fordecyt/fordecyt-2018-01/16743-anexo-5-3-demanda-2018-01/file>

Correa, B. A., y Guzmán, N. E. (2006). Zootecnia apícola. *Introducción a la Zootecnia. México DF: FMVZ-UNAM*, 403-433.

Díaz, M. D, Díaz, Y., López, B. M., Gómez, J. M, y Rodríguez, C. G. (2009). El Polen Apícola. Recuperado en: <http://www.actaf.co.cu/revistas/apiciencia/2011-2/2polen.pdf>

Fangio, M. F., Iurlina, M. O., y Fritz, R. (2007). Actividad antimicrobiana de mieles del sudeste de la provincia de Buenos Aires frente a *Escherichia coli*. *Revista argentina de microbiología*, 39(2), 102-123.

Flores, T. G. y Herrera, R. A. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud pública de México*, 47, 388-390.

Franco, L., Matiz, G., Bolivar, I. P., y Gómez, H. (2013). Actividad Antibacteriana in vitro de Extractos y Fracciones de *Physalis peruviana* L. y *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 12(3).

Guzmán, M., Balboa, C., Vandame, R., Albores, M. L. y González-Acereto, J. (2011). Manejo de las abejas nativas sin aguijón en México. Chiapas, México. *El Colegio de la Frontera Sur*.

Herrero, F. A., y Olsen, J. E. (2018). *Salmonella* Typhimurium metabolism affects virulence in the host. *Food microbiology*, 71, 98-110.

Jure, M. A., Condorí, S., Leotta, G. A., Chinen, I., Miliwebsky, E., Allori, C., Aulet, O., y de Castillo, M. C.. (2010). Detección, aislamiento y caracterización

de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de Concepción, provincia de Tucumán. *Revista argentina de microbiología*, 42(4), 284-287.

Kerr, W. E. (1994). Communication among *Melipona* workers (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Behavior*, 7(1), 123-128.

Kieran, J. y Olivia, M. (2018). *Listeria Monocytogenes* in foods. *Advances in Food and Nutrition Research*, 86(7), 181-213

Kljujev, I., Raicevic, V., Jovicic, P. J., Vujovic, B., Mirkovic, M., y Rothballer, M. (2018). *Listeria monocytogenes*—Danger for health safety vegetable production. *Microbial pathogenesis*, 120, 23-31.

Kwakman, P. H., Velde, A. A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke, G. C., Zaat, S. A., (2010). How honey kills bacteria. *FASEB J.* 24, 2576-2582

Labougle, J. M., y Zozaya, J. A. (1986). La apicultura en México. *Ciencia y desarrollo*, 12(69), 17-36.

Libonatti, C., Soledad, V., Basualdo, M., (2014). Antibacterial activity of honey: a review of honey around the world. *J. Microbiol. Antimicrob.* 6, 51-56, 56.

López, M. C., Álvarez, M. D., y Morales, A. A. (2017). La clorhexidina, bases estructurales y aplicaciones en; la estomatología. *Gaceta Médica Espirituana*, 11(1), 8.

Manyi-Loh, C. E., Clarke, A. M., Munzhelele T., Green, E., Mkwetshana, N. F., Ndip, R. N. (2010). Selected South African Honey and Their Extracts Posses *In Vitro* Anti-*Helicobacter pylori* Activity. *Archives of Medical Research*, 41, 324-331

March, R. G. (2017). Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(3), 182-188.

Miarelli, M., Drumo, R., Signorelli, F., Marchitelli, C., Pavone, S., Pesciaroli, M., y Alborali, G. L. (2016). *Salmonella* Typhimurium infection primes a nutritive mechanism in piglets. *Veterinary Microbiology*, 186, 117-125.

Minango, B. L. (2017). Evaluación de métodos de sensibilidad en la efectividad antimicrobiana de la miel de abeja sobre cepa certificada de *S. aureus*. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Naber, C. K. (2009). *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Epidemiology, Pathophysiology, and Management Strategies. *Clinical Infectious Diseases*, 48(4), 231-237.

Nataro, J. P. y Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142-201.

Nates, P. G. (1995). Las abejas sin aguijón del género *Melipona* (Hymenoptera: Meliponinae) en Colombia. *Bol. Mus. Ent. Univ. Valle* 3(2), 21-33.

Nikaido, H. (1996). Multidrug Efflux Pumps of Gram Negative Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 178(20), 5853-5859.

Nzeako, B C, Hamdi, J. (2000). Antimicrobial Potential of Honey on some Microbial Isolates. *Medical Sciences*, 2, 75-79.

Olaitan, P. B., Adeleke, O. E., Ola, I. O., (2007). Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *Afr Health Sci* 7, 159-165.

Oliveros, C., Gutiérrez, C., Díaz, C. (2014). Actividad Antimicrobiana de mieles de *Apis mellifera* de la Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, 67(2).

OMS, Organización Mundial de la Salud. (2018a). *E. coli*. Recuperado en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>

OMS, Organización Mundial de la Salud. (2018b). *Salmonella* (no tifoidea). Recuperado en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))

Osés, M., Pascual, M. A., Fuente, D., Pablo, A., Fernández, M. A., y Sancho, M. T. (2016). Comparison of Methods to Determine Antibacterial Activity of Honeys against *Staphylococcus aureus*. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*, 78, 29-33.

Parra, M., Durango, J., Máttar, S. (2002). Microbiología, Patogénesis, Epidemiología, Clínica y Diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *MVZ Córdoba*, 7(2), 187-200.

Pozo, Y. y Michelle, G. (2016). Análisis de polifenoles totales y capacidad antimicrobiana de mieles de abeja de aguacate, alfalfa y eucalipto como tratamiento alternativo de infecciones de interés veterinario causadas por *staphylococcus epidermidis* y *aureus*. *Facultad de Ciencias de la Salud. UDLA. Quito*.

Ravazzi, G. (2017). Las abejas. Recuperado de: [https://books.google.com.mx/books?id=yqs\\_DwAAQBAJ&pg=PT14&lpg=PT14](https://books.google.com.mx/books?id=yqs_DwAAQBAJ&pg=PT14&lpg=PT14)

&dq=espolon+en+abejas&source=bl&ots=dZkS\_l35ri&sig=GZbvJ\_xGMRiKzVwo4\_6XPKUulGU&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjBzaLBpHeAhVNL6wKHdsQCZA4ChDoATABegQlCBAB#v=onepage&q=espolon%20en%20abejas&f=false  
Rinderer, E. T. (2013). *Bee Genetics and Breeding*. United Kingdom.

Recuperado de:

[https://books.google.com.mx/books?id=MyTgBAAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=MyTgBAAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

Rodríguez, A. G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública de México*, 44, 464-475.

Ruttner, F. (2013). Biogeography and taxonomy of honeybees. *Springer Science & Business Media*. Recuperado de <https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=d1rmCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=classification+of+honey+bees&ots=QnzXOyDtp1&sig=Mp2H9U5tOwxXB6v1jEr-9UeVvxo#v=onepage&q=classification%20of%20honey%20bees&f=false>

SAGARPA. (2003). Manual Básico Apicultura. *Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana*, 52.

SAGARPA (2010). Revista Claridades Agropecuarias. Recuperado de <https://info.aserca.gob.mx/claridades/marcos.asp?numero=199>

SAGARPA. (2018). Manual de Buenas Prácticas de Producción de la Miel. Recuperado de: <http://www.sagarpa.mx/ganaderia/Publicaciones/Paginas/manualesapicolas.aspx>

Schencke, C., Vásquez, B., Sandoval, C., Del Sol, M. (2016). El Rol de la Miel en los Procesos Morfofisiológicos de Reparación de Heridas. *Int. J. Morphol.* 34(1), 385-395.

Silici, S., Sagdic, O., Ekici, L., (2010). Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys. *Food Chem.* 121, 238-243.

Soares, H.M., Jacob, C.R.O., Carvalho, S.M., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., (2015). Toxicity of Imidacloprid to the Stingless Bee *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 94, 675-680.

Soto, M., Enrique, L., Elizarraras, B., Soto, I. (2017). Situación apícola en México y perspectivas de la producción de miel en el Estado de Veracruz. *Revista de Estrategias de Desarrollo Empresarial.* 3, 40-64.

Souza, B., Roubik, D., Barth, O., Heard, T., Enríquez, E., Carvalho, C., Villas, B.J., Marchini, L., Locatelli, J., Persano, O.L., Almeida, L., Bogdanov, S., Vit, P. (2006). Composition of stingless bee honey: Setting Quality Standards. *Interciencia*, 31(12), 867-875.

Taormina, P. J., Niemira, B. A., Beuchat, L. R., (2001). Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 217-225.

Torres, A., Garedew, A., Schmolz, E., & Lamprecht, I. (2004). Calorimetric investigation of the antimicrobial action and insight into the chemical properties of “angelita” honey a product of the stingless bee *Tetragonisca angustula* from Colombia. *Thermochimica Acta*, 415(1-2), 107-113.

Torres, R. N., Lopes, J. A., Moita, N. J., Cito, A. M, (2008). Volatile constituents of propolis from Piauí (Brazil). *Quim. Nova* 31, 479-485.

Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. (2007). Introducción a la microbiología. Buenos Aires, Argentina.

Truchado, P., Lopez, G. F., Gil, M. I., Tomas, B. F, Allende, A., (2009). Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics. *Food Chem.* 115, 1337-1344.

Ulloa, A. J., Cortez, M. M., Rodriguez R. R., Resendiz V. J., y Rosas U. P. (2010). La miel de abeja y su importancia. *Rev. Fuente*, 4, 11-18.

Voidarou, C., Alexopoulos, A., Plessas, S., Karapanou, A., Mantzourani, I., Stavropoulou, E., Fotou, K., Tzora, A., Skoufos, I., Bezirtzoglou, E., (2011). Antibacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Anaerobe* 17, 375-379.

Vorlova, L., Karpiskova, R., Chabiniokova, I., Kalabova, K., Brazdova, Z., (2005). The antimicrobial activity of honeys produced in the Czech Republic. *Czech J. Anim. Sci.* 50, 376-384.

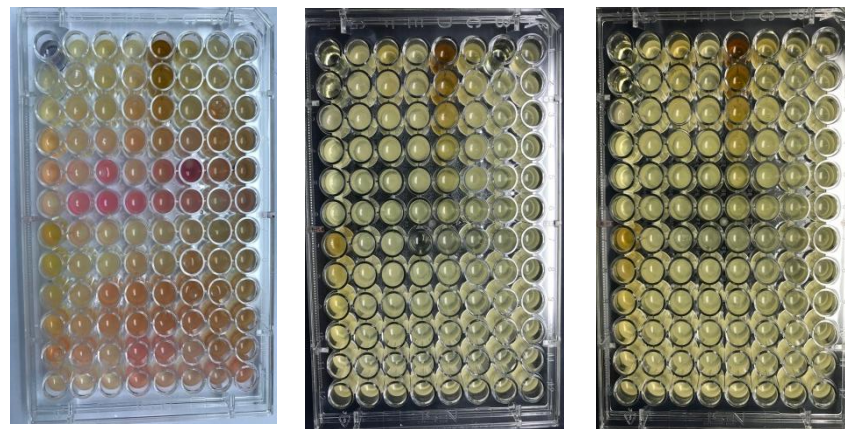
Zamora, L. G., Arias, M. L., (2011). Calidad microbiológica y Actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón. *Rev Biomed.* 22, 59-66.

Zendejas, M. G., Avalos, F. H., y Soto, P. M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, Patogenicidad y Métodos de identificación. *Revista Biomédica*, 25(3), 129-143.

**ANEXO 1.** Resultados de MIC y MBC probadas sobre *Staphylococcus aureus*



**Figura 1.** Triplicado con mieles de M0 a M15, con controles positivos y negativos. Primera caja con prueba de MBC.



**Figura 2.** Triplicado con mieles de M17 a M33. Primera caja con prueba de MBC.

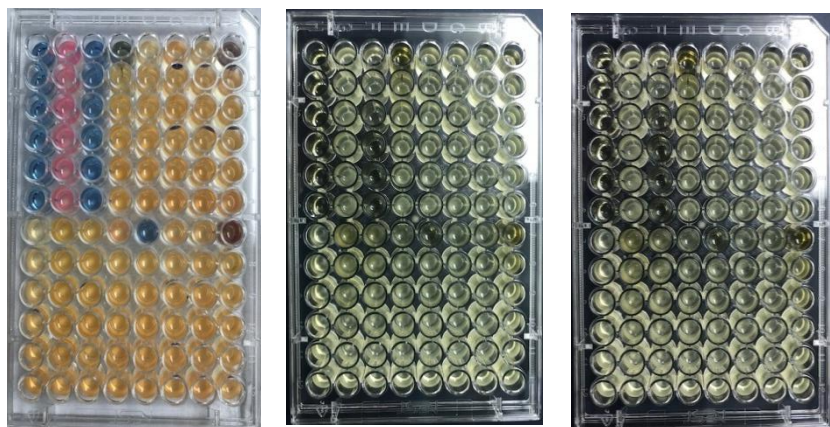


**Figura 3.** Triplicado con mieles de M34 a M49. Primera caja con prueba de MBC.

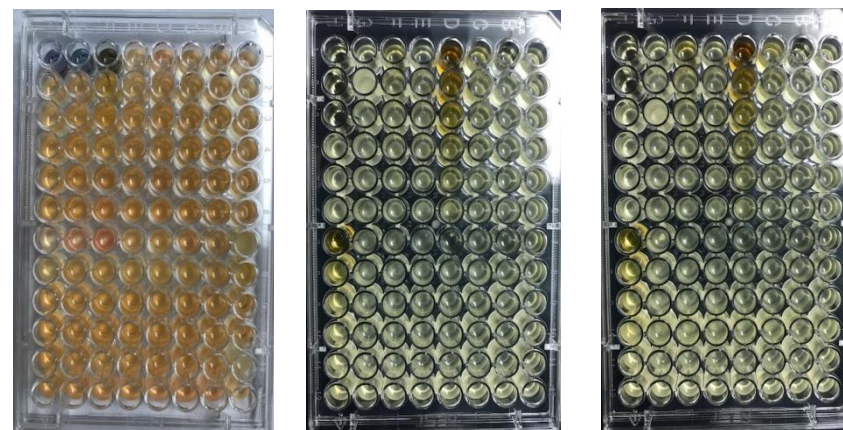


**Figura 4.** Triplicado con mieles de M50 a M60, 3 controles con clorhexidina y 2 controles con bacteria. Primera caja con prueba de MBC.

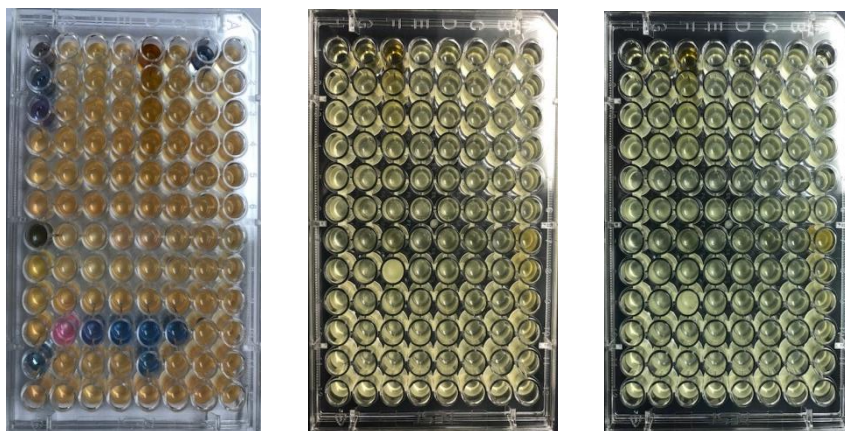
**ANEXO 1 (Continuación).** Resultados de MIC y MBC probadas sobre *Listeria monocytogenes*



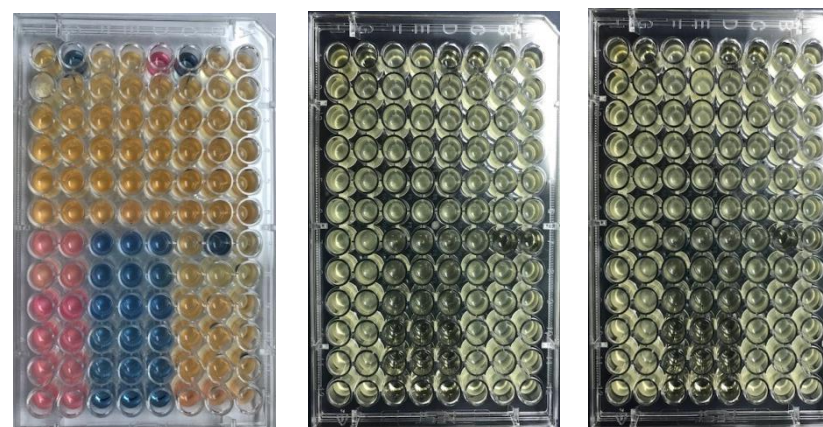
**Figura 5.** Triplicado con mieles de M0 a M15, con controles positivos y negativos. Primera caja con prueba de MBC.



**Figura 6.** Triplicado con mieles de M0 a M15, con controles positivos y negativos. Primera caja con prueba de MBC.



**Figura 7.** Triplicado con mieles de M34 a M49. Primera caja con prueba de MBC.

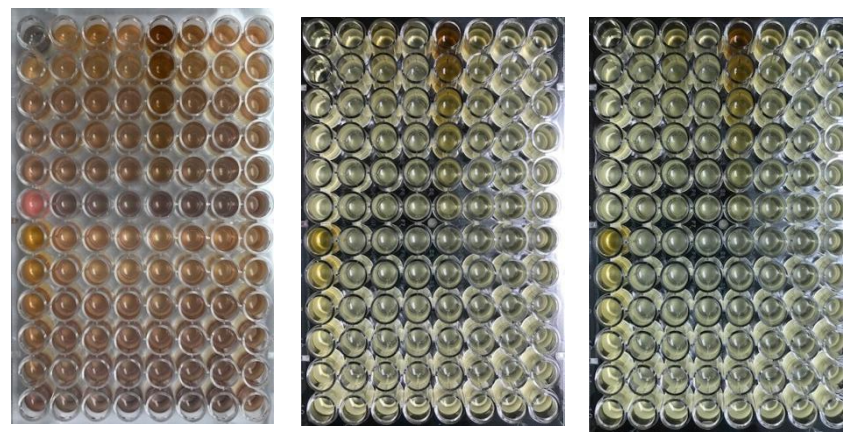


**Figura 8.** Triplicado con mieles de M50 a M60, 3 controles con clorhexidina y 2 controles con bacteria. Primera caja con prueba de MBC.

**ANEXO 1 (Continuación).** Resultados de MIC y MBC probadas sobre *Escherichia coli*



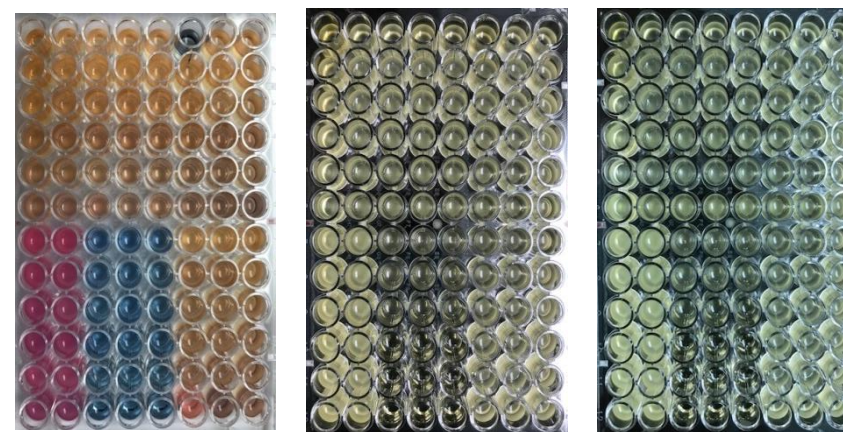
**Figura 9.** Triplicado con mieles de M0 a M15, con controles positivos y negativos. Primera caja con prueba de MBC.



**Figura 10.** Triplicado con mieles de M17 a M33, con controles positivos y negativos. Primera caja con prueba de MBC.



**Figura 11.** Triplicado con mieles de M34 a M49. Primera caja con prueba de MBC.



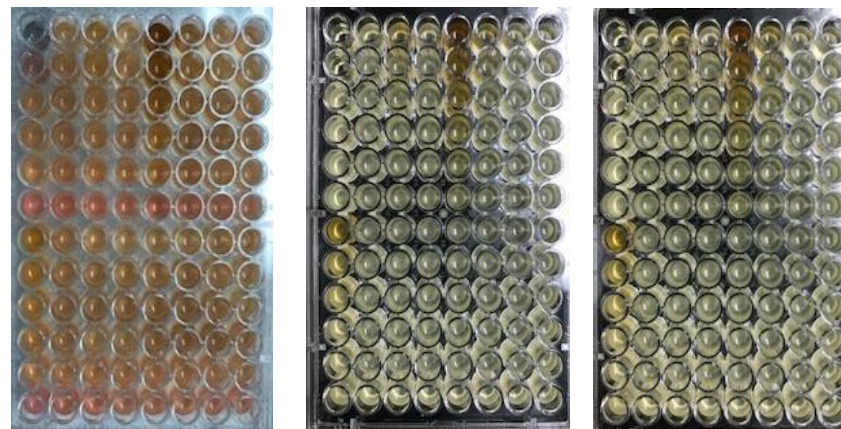
**Figura 12.** Triplicado con mieles de M50 a M60, 3 controles con clorhexidina y 2 controles con bacteria. Primera caja con prueba de MBC



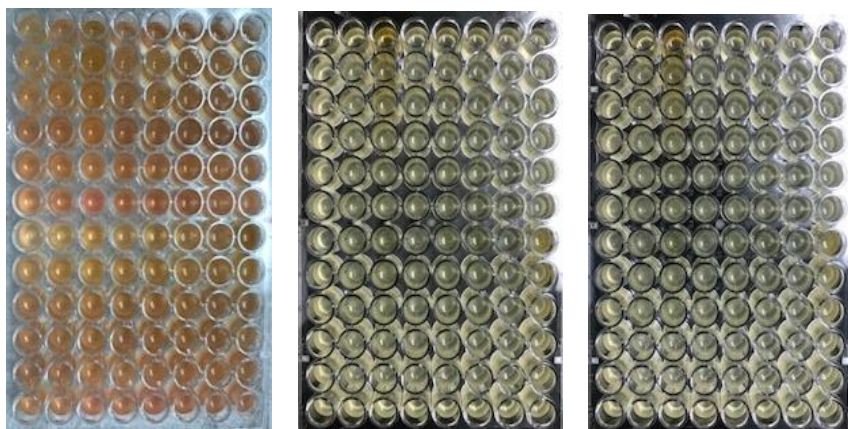
**ANEXO 1 (Continuación).** Resultados de MIC y MBC probadas sobre *Salmonella Typhimurium*



**Figura 13.** Triplicado con mieles de M0 a M15, con controles positivos y negativos. Primera caja con prueba de MBC.



**Figura 14.** Triplicado con mieles de M17 a M33, con controles positivos y negativos. Primera caja con prueba de MBC.



**Figura 15.** Triplicado con mieles de M34 a M49. Primera caja con prueba de MBC.

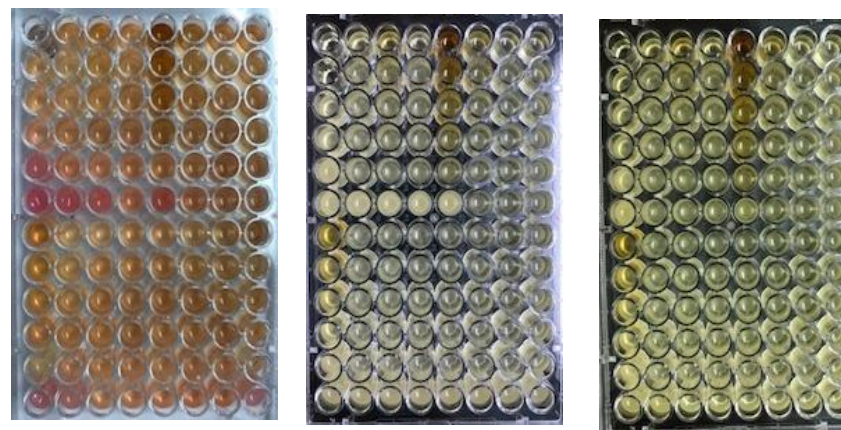


**Figura 16.** Triplicado con mieles de M50 a M60, 3 controles con clorhexidina y 2 controles con bacteria. Primera caja con prueba de MBC

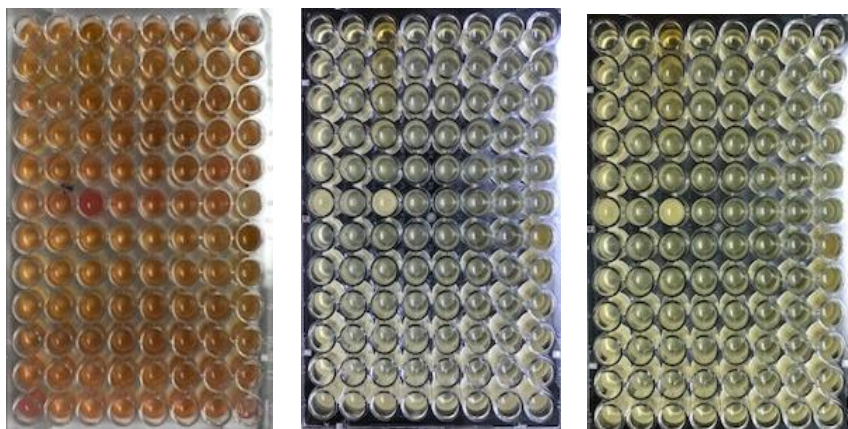
**ANEXO 1 (Continuación).** Resultados de MIC y MBC probadas sobre *Escherichia coli* enteropatogénica



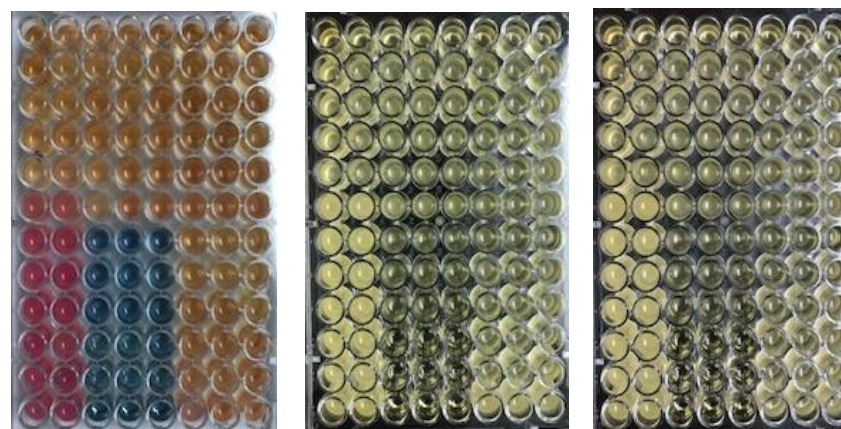
**Figura 17.** Triplicado con mieles de M0 a M15, con controles positivos y negativos. Primera caja con prueba de MBC.



**Figura 18.** Triplicado con mieles de M17 a M33, con controles positivos y negativos. Primera caja con prueba de MBC.

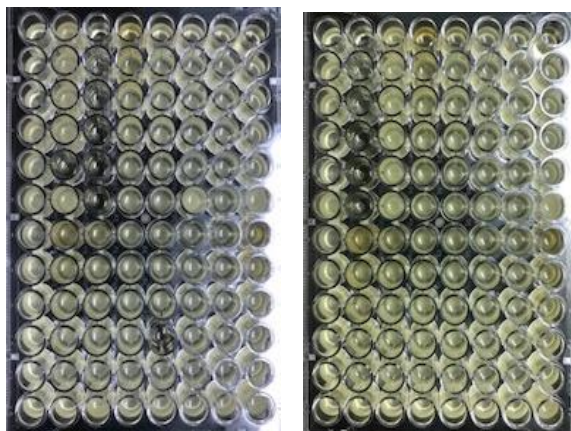


**Figura 19.** Triplicado con mieles de M34 a M49. Primera caja con prueba de MBC.

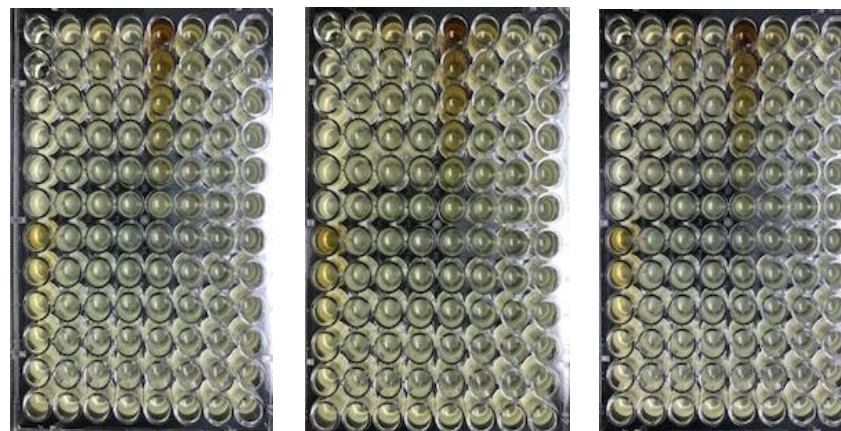


**Figura 20.** Triplicado con mieles de M50 a M60, 3 controles con clorhexidina y 2 controles con bacteria. Primera caja con prueba de MBC

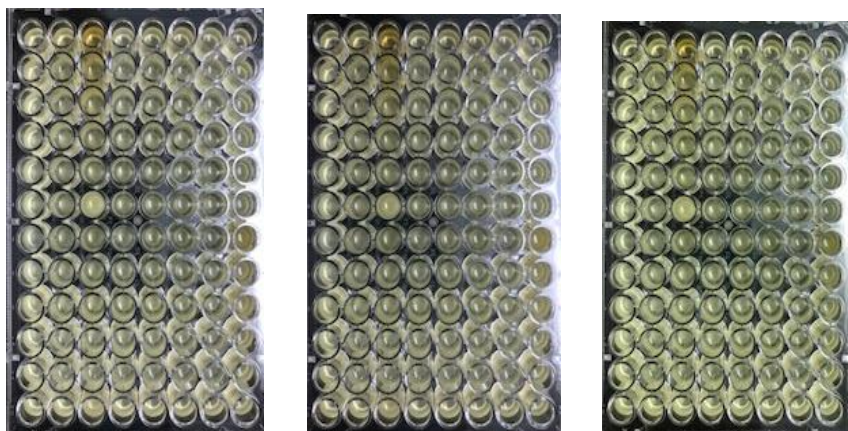
**ANEXO 1 (Continuación).** Resultados de MIC y MBC probadas sobre *Escherichia coli* enterotoxigénica



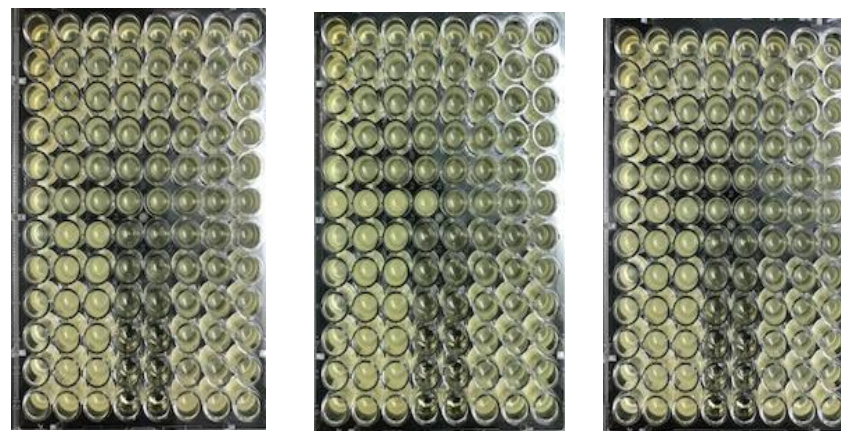
**Figura 21.** Duplicado con mieles de M0 a M15, con controles positivos y negativos.



**Figura 22.** Triplicado con mieles de M17 a M133, con controles positivos y negativos.



**Figura 23.** Triplicado con mieles de M34 a M49.



**Figura 24.** Triplicado con mieles de M50 a M60, 3 controles con clorhexidina y 2 controles con bacteria.