

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA



“Evaluación in vitro del efecto antimicrobiano de la miel de eucalipto sobre
Mammaliicoccus sciuri”

DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO
REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MÉDICO VETERINARIO

AUTOR:

SEBASTIÁN EFRAÍN TIXE LARA

TUTORA:

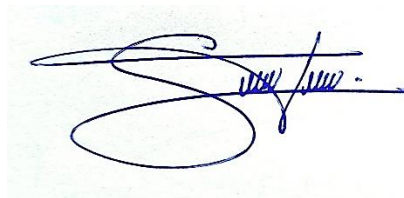
Dra. SANDRA CRUZ, PhD.

CEVALLOS - ECUADOR

2024

AUTORÍA DEL TRABAJO DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, SEBASTIÁN EFRAÍN TIXE LARA, portador de la cédula de identidad número: 1805329164, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de Investigación titulado: Evaluación in vitro del efecto antimicrobiano de la miel de eucalipto sobre *Mammaliicoccus sciuri*, es original, auténtico y personal. En la virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indica las fuentes de información consultadas.



Sebastián Efraín Tixe Lara

C.I. 1805329164

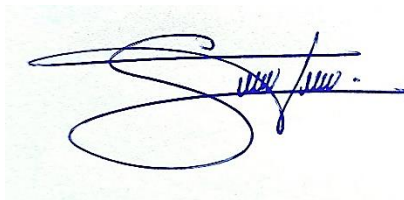
AUTOR

DERECHOS DEL AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado: Evaluación in vitro del efecto antimicrobiano de la miel de eucalipto sobre *Mammalicoccus sciuri*, como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.



Sebastián Efraín Tixe Lara

C.I. 1805329164

AUTOR

“Evaluación in vitro del efecto antimicrobiano de la miel de eucalipto sobre
Mammalicoccus sciuri”

REVISADO Y APROBADO POR:

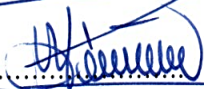


.....
Dra. Sandra Cruz, PhD

TUTOR

APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

FECHA:



.....
Ingeniero Patricio Núñez, PhD

PRESIDENTE DE TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

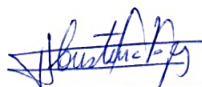
.....
08/02/2024



.....
Méd. Mg. Borja Caicedo Byron Enrique

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....
08/02/2024



.....
BQF. Mg. López Villacís Isabel Cristina

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....
08 - 02 - 2024

DEDICATORIA

Dedico este trabajo en primer lugar a Dios, por permitirme cumplir cada una de mis metas, por brindarme salud, sabiduría y fortaleza para continuar aún en los momentos más difíciles.

A mis padres Efraín y Carmen, por ser el pilar fundamental en este proceso, por creer en mí, ser mi ejemplo a seguir, brindarme su amor y apoyo incondicional. Este logro también es tuyo querida mamá.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a mi tutora de tesis, la Dra. Sandra Cruz. Su experiencia, comprensión y paciencia contribuyeron a mi formación profesional. Su guía constante y su fe inquebrantable en mis habilidades me han motivado a alcanzar una meta más. No tengo palabras para expresar mi gratitud por su inmenso apoyo durante este viaje.

Gracias infinitas a mis padres y a mi hermana Carolina por su sacrificio y apoyo. Su fe en mí, incluso en los momentos más difíciles, ha sido el pilar de este logro, Sin ustedes, todo esto no habría sido posible.

Me gustaría agradecer a la Universidad San Francisco de Quito, por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de avanzar en mi investigación. Agradezco de manera especial al Doctor José Miguel Álvarez, pues su disposición para guiarme ha sido fundamental para el desarrollo de esta tesis.

Un sincero agradecimiento a todos mis amigos y compañeros que estuvieron presentes en los momentos de estrés y alegría durante este largo y retador camino. Gracias por ser mi punto de apoyo, mi equipo de aliento y, lo más importante, la familia que yo elegí.

Finalmente agradezco a todas las personas que han formado parte de este camino, aunque ya no se encuentren presentes, su apoyo fue fundamental para alcanzar esta meta (1107).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO I	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1 Antecedentes investigativos	2
1.2 Categorías Fundamentales	6
1.2.1 Miel.....	6
1.2.2 <i>Staphylococcus</i>	9
1.2.3 <i>Staphylococcus coagulasa negativa (SCN)</i>	10
1.2.4 <i>Mammalicoccus sciuri</i>	12
1.3 Objetivos	13
1.3.1 Objetivo general	13
1.3.2 Objetivos específicos.....	13
1.4 Hipótesis	14
CAPÍTULO II	15
2 METODOLOGÍA	15
2.1 Ubicación del estudio	15
2.2 Características del Lugar	15
2.3 Materiales	17
Material biológico	18
2.4 Factores de estudio	18
2.5 Análisis estadístico	18
2.5.1 Tamaño de la muestra.....	18
2.5.2 Diseño experimental.....	19
2.6 Procedimiento	20
2.6.1 ETAPA 1. Análisis fisicoquímico de la miel de eucalipto.....	20
2.6.2 ETAPA 2. Evaluación del efecto antimicrobiano	25
2.6.3 ETAPA 3. Número de unidades formadoras de colonia (UFC).....	27
2.6.4 Crecimiento bacteriano en medio líquido.....	27

2.7	Variable respuesta.....	28
2.8	Tratamientos.....	29
2.9	Procesamiento de la información.....	29
CAPÍTULO III		30
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
3.1	Caracterización fisicoquímica de la miel de eucalipto.....	30
3.2	Pruebas de difusión en agar modificado con pocillos	36
3.3	Conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC)	39
3.4	Crecimiento bacteriano en medio líquido	41
CAPÍTULO IV		42
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		43
ANEXOS		48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>M. sciuri</i>	12
Tabla 2. Características ambientales del Laboratorio USFQ.	16
Tabla 3. Características ambientales del Laboratorio Microbiología UTA.	16
Tabla 4. Materiales	17
Tabla 5. Rangos promedio de diferentes diluciones de miel de eucalipto sobre <i>Mammalicoccus sciuri</i>	36
Tabla 6. Influencia de miel de abeja y solución azucarada sobre las unidades formadoras de colonias en el medio de cultivo Agar Cerebro Corazón (BHI).	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento bacteriano en medio líquido	41
--	----

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar el efecto antimicrobiano de la miel de eucalipto a diferentes concentraciones en cultivos de *Mammaliicoccus sciuri*. La primera etapa del estudio consistió en la caracterización fisicoquímica de la miel de eucalipto, a fin de establecer aquellos factores que determinan sus propiedades antimicrobianas, se obtuvieron los siguientes resultados: Conductividad eléctrica (0,64 mS /cm), Humedad (14,80 %), Color ámbar claro (50,40 mmPFund), Cenizas (0,46 %), pH (5.43), HMF (11,83 mg HMF / kg), Índice de diastasa (22,71 °S), Fenoles (80,15 GAE / 100 g) y Flavonoides (1,49 mg QE / 100 g).

En la segunda etapa se comprobó el efecto antimicrobiano de la miel de eucalipto utilizando el método de difusión en agar modificado en pocillos, además se compararon diferentes diluciones de miel de eucalipto sobre *M. sciuri* con la finalidad de encontrar la dilución activa mínima (MAD) a la que se inhibe el crecimiento bacteriano, determinando un valor de MAD del 15%.

La tercera etapa de este estudio consistió en definir la influencia de la miel de eucalipto sobre unidades formadoras de colonia (UFC) en el medio de cultivo agar cerebro corazón y compararlo con una solución azucarada elaborada de forma artificial que pretende imitar la composición química de la miel observando valores como: para la miel de eucalipto ($3,85 \times 10^6$ UFC/ml) y para la solución azucarada ($6,42 \times 10^6$ UFC/ml), evidenciando el efecto antimicrobiano de la miel de eucalipto sobre *M. sciuri*.

Palabras Clave: *Mammaliicoccus sciuri*, efecto antimicrobiano, miel, eucalipto

ABSTRACT

The objective of this research work was to determine the antimicrobial effect of eucalyptus honey at different concentrations on cultures of *Mammalicoccus sciuri*. The first stage of the study consisted of the physicochemical characterization of eucalyptus honey, in order to establish those factors that determine its antimicrobial properties, the following results were obtained: Electrical conductivity (0.64 mS /cm), Humidity (14.80 %), Light amber color (50.40 mmPFund), Ash (0.46 %), pH (5. 43), HMF (11.83 mg HMF / kg), Diastase index (22.71 °S), Phenols (80.15 GAE / 100 g) and Flavonoids (1.49 mg QE / 100 g).

In the second stage, the antimicrobial effect of eucalyptus honey was tested using the diffusion method in modified agar in wells, and different dilutions of eucalyptus honey were compared on *M. sciuri* in order to find the minimum active dilution (MAD) at which bacterial growth is inhibited, determining a MAD value of 15%.

The third stage of this study consisted of defining the influence of eucalyptus honey on colony forming units (CFU) in the brain heart agar culture medium and comparing it with an artificially prepared sugar solution that pretends to imitate the chemical composition of honey, observing values such as: for eucalyptus honey (3.85×10^6 CFU/ml) and for the sugar solution (6.42×10^6 CFU/ml), evidencing the antimicrobial effect of eucalyptus honey on *M. sciuri*.

Key words: *Mamaliicocus sciuri*, antimicrobial effect, honey, eucalyptus.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

Durante los últimos años, el desarrollo de nuevos antibióticos ha disminuido, contando actualmente con pocas empresas que se encuentren activas dentro del área farmacéutica. Por otro lado, las bacterias resistentes a estos fármacos han presentado un aumento significativo, en su mayoría debido al uso excesivo e indiscriminado de antibióticos. Esto ha desatado una crisis a nivel global e involucra medicamentos de uso sistémico, así como tópico (**Morrone et al., 2018**).

Debido a dificultad para tratar este tipo de problemas, ha surgido el interés por utilizar nuevas herramientas, las cuales se basan principalmente en el potencial antimicrobiano que brindan ciertos tratamientos no convencionales. De manera particular, el efecto antimicrobiano de la miel, que ha sido reconocido desde la antigüedad gracias a sus propiedades para curar heridas, lo que ha captado la atención en área de la salud durante los últimos años (**Morrone et al., 2018**).

La gran variedad de mieles conocidas en la actualidad difiere en cuanto al potencial de su actividad antimicrobiana, debido a que este efecto es atribuido en gran parte a la producción de peróxido de hidrógeno, alta osmolaridad, baja actividad del agua, pH, acidez libre y la acción de varios componentes fitoquímicos, y en menor medida a factores tales como: ubicación geográfica, planta de la que procede y condiciones relacionadas a la cosecha, procesamiento y almacenamiento (**Morrone et al., 2018**).

De manera particular, la miel monofloral de Eucalipto, presenta una potente actividad antimicrobiana. Esta miel procede del néctar recolectado por las abejas *Apis mellifera* del árbol de Eucalipto (*Eucalyptus spp*); además, contiene elevadas concentraciones del

compuesto antibacteriano 1,2-dicarbonil metilglioxal, que se caracteriza por su desempeño como biomarcador en situaciones de estrés oxidativo y daño celular; a bajas concentraciones posee actividad antimicrobiana contra una gran cantidad de bacterias como: *Staphylococcus* y *Helicobacter*; además, su aplicación por vía tópica favorece la cicatrización **(Bobis et al., 2020)**.

Actualmente el escaso conocimiento sobre las propiedades antimicrobianas de la miel de eucalipto dificulta su aplicación terapéutica en entornos clínicos, por ello la presente investigación posee como objetivo evaluar el efecto antimicrobiano de la miel de eucalipto sobre *Mammalicoccus sciuri* **(Bobis et al., 2020)**.

1.1 Antecedentes investigativos

En un estudio realizado por **(Pozo Yépez, 2016)**, se evaluó la actividad antibacteriana de diferentes tipos de miel producidas en las provincias de Pichincha y Carchi, se utilizó una muestra representativa de 12 mieles monoflorales, cinco muestras de aguacate, alfalfa y dos muestras de eucalipto, a las cuales se les realizó diferentes diluciones que fueron analizadas en cepas de *Staphylococcus aureus* y *epidermidis*. La actividad antimicrobiana se evaluó de forma cualitativa gracias a la formación de diferentes halos de inhibición bacteriana.

Los resultados obtenidos de forma preliminar permitieron llegar a la conclusión que las mieles monoflorales presentan un evidente efecto inhibitorio frente a cepas de *S. aureus* y *epidermidis*. Se determinó que la actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* fue mayor, mostrándose altamente sensible a los defectos bacteriostáticos, aunque la miel de alfalfa presentó una mayor capacidad mostrando la formación de halos de inhibición de carácter significativo durante las primeras 8 horas de incubación, por otro lado, la miel de aguacate

resaltó por su capacidad antioxidante presentando un contenido elevado polifenoles que rodeaba los 796.69mg EAG/100g miel **(Pozo Yépez, 2016)**.

El trabajo realizado por **(Proaño Artieda, 2020)**, tuvo por objetivo determinar un tratamiento óptimo cuyas características térmicas sean capaces de evitar procesos de cristalización en la miel y de esta manera impedir la pérdida de propiedades antimicrobianas, además se comparó este efecto al aplicarla a distintas concentraciones sobre cepas de bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* mediante diferentes experimentos en los cuales se evaluó la inhibición en los procesos de formación de biopelículas y ruptura de biopelículas preformadas **(Proaño Artieda, 2020)**.

Para este estudio se realizó un análisis polínico de alrededor de 30 muestras de miel monofloral de eucalipto, estas muestras fueron utilizadas para llevar a cabo diferentes ensayos relacionados con la actividad antimicrobiana mediante métodos basados en mediciones de absorbancia por espectrofotometría, para posterior determinar las diferencias significativas en cuanto a los porcentajes relacionados a la actividad antimicrobiana mediante ANOVA **(Proaño Artieda, 2020)**.

Fue posible confirmar un origen monofloral correspondiente al eucalipto y además se determinó que al utilizar mieles carentes de tratamiento térmico se puede verificar una diferencia de carácter significativo a comparación de un tratamiento control, lo que confirma la capacidad antimicrobiana de este tipo de miel. Como parte de los resultados fue posible observar que la miel presenta mejores resultados sobre bacterias gram positivas **(Proaño Artieda, 2020)**.

En la investigación realizada por **(Carrión Castillo, 2016)**, se evalúa la efectividad antimicrobiana de dos tipos de miel producidos en diferentes regiones del Ecuador, una de la Costa y otra de la Sierra, frente a diferentes cepas de *Streptococcus mutans*. El estudio se realizó in vitro utilizando el método de difusión en disco, para lo cual se recrearon 10 cajas petri, se utilizaron diferentes concentraciones 80, 50, 25 y 12% de los dos tipos de miel y además gluconato de clorhexidina al 0.12% a razón del control positivo. Posteriormente se incubó durante 48 horas y se midieron los halos de inhibición **(Carrión Castillo, 2016)**.

Los resultados obtenidos posteriores a este estudio se analizaron mediante pruebas estadísticas. Los cuales arrojaron sensibilidad a la miel en concentraciones del 80 y 50%, en tanto que para la miel de la costa la sensibilidad en concentraciones del 80% **(Carrión Castillo, 2016)**.

El propósito del estudio realizado por **(Morróni et al., 2018)**, fue realizar una comparación antimicrobiana de cuatro tipos de mieles de diferentes orígenes geográficos y florales, para este estudio se utilizaron: miel de *Melipona beecheil* procedente de Cuba y 3 tipos de mieles de *Apis mellifera*; miel de Manuka procedente de Nueva Zelanda, miel de *A. mellifera* procedente de Cuba y miel africana miel procedente de Kenia. Los diferentes parámetros fisicoquímicos se encontraban dentro de los rangos reportados en la literatura, excepto por la miel *beecheil* que poseía un carácter más ácido a comparación de las demás **(Morróni et al., 2018)**.

En general todas las mieles produjeron una marcada interrupción en el proceso de formación de biopelículas y en aquellas preformadas. Los diferentes cambios estructurales que fueron observados gracias a la acción de la miel *beecheil* especialmente sobre células de *Stafilococos aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* se evidenciaron gracias al uso de técnicas basadas en la microscopía electrónica de transición, esto sugiere una

acción antimicrobiana poderosa (**Morroni et al., 2018**).

En el estudio llevado a cabo por (**Valdés-Silverio, 2018**) se evalúa el perfil polínico al igual que la composición química, capacidad antioxidante, parámetros físicos químicos y actividad antimicrobiana de la miel monofloral de eucalipto obtenida de la región andina del Ecuador. En dónde fue posible determinar que el 100% de las muestras se encontraban dentro de los estándares de calidad emitidos por la legislación internacional, exceptuando el hidroximetilfural que difiere en tres muestras de las evaluadas (**Valdés-Silverio, 2018**).

El contenido de flavonoides y fenoles, así como de aminoácidos libres se enmarcó dentro de los rangos establecidos previamente organismos internacionales, más no se encontró contaminación microbiana. La miel de eucalipto además demostró propiedades capaces de inhibir el crecimiento en bacterias como *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Streptococcus piógenes* y *Eschericha coli* (**Valdés-Silverio, 2018**).

En el trabajo realizado por (**Contreras-Martínez, 2020**) se determinó la actividad antioxidante y el contenido de fenoles total en muestras de miel producidas en México, se sometió a análisis cuatro variedades de miel, en términos de contenido fenólico total y capacidad antioxidante mediante diferentes métodos de extracción.

Los resultados de este estudio arrojaron diferencias significativas entre muestras de miel especialmente el contenido fenólico total, el pH y el contenido de agua; bien la capacidad antioxidante sometida a métodos FRAP y ABTS. Al realizar la extracción metanólica se observó un mayor contenido fenólico (144mg de GAE 100 g⁻¹) en tanto la que la extracción llevada a cabo con agua, arrojó resultados en dónde la capacidad antioxidante era mayor DPPH (1118,3 umol eq Trolox 100g) (**Contreras-Martínez, 2020**).

El estudio llevado a cabo por **(Ortega-Bonilla, 2016)** tuvo por objetivo evaluar la calidad de 24 muestras diferentes de miel de eucalipto comercializadas en Colombia, en donde se determinaron, siguiendo procedimientos estandarizados, diferentes parámetros como: humedad (16.45%), pH (5.02), color (91,65mm PFund), contenido fenólico (76,57quercetin/100g), prolina (180,68 mg/kg) y flavonoides (5,69 mg Ácido galico/100g).

La mayor parte de las muestras que fueron analizadas pulieron cada una de las regulaciones tanto para la humedad, acidez libre y HMF. Además, fue posible detectar estimaciones convencionales en los resultados referentes flavonoides y fenoles, concluyendo que las mieles cumplen con Los criterios de calidad necesarios para ser comercializadas **(Ortega-Bonilla, 2016)**.

1.2 Categorías Fundamentales

1.2.1 Miel

1.2.1.1 Definición

Se puede definir a la miel como una solución sobresaturada de azúcar, misma que es producida por las abejas a partir de sustancias como el néctar de diversas flores, secreciones producidas por plantas, o también a partir de excreciones de algunos insectos. Este tipo de sustancias son recolectadas por las abejas y sufren un proceso de transformación gracias a la combinación de ciertas soluciones cuyas características específicas permiten su maduración en los panales **(García-Tenesaca et al., 2018)**.

Hablando desde un punto de vista químico, la miel es considerada como una solución sobresaturada de azúcares pues se encuentra compuesta por fructosa y glucosa en su mayoría; en menor medida se pueden hallar diferentes compuestos que brindan propiedades antimicrobianas, como por ejemplo proteínas, aminoácidos libres, polifenoles y enzimas (**García-Tenesaca et al., 2018**).

1.2.1.2 Clasificación

De acuerdo su origen botánico, es posible clasificar a la miel en diferentes categorías: miel floral, la cual es obtenida principalmente a partir del néctar de las flores, como subcategoría encontramos la miel monofloral o unifloral en donde las abejas únicamente se alimentan de un solo tipo de planta y reciben el nombre de la planta, y la miel multifloral o polifloral, la cual se origina gracias a la recolección de diferentes fuentes botánicas; por otro lado, la miel de melaza, que se produce a partir de secreciones de insectos, que son capaces de perforar células vegetales, ingerir savia y secretarla de nuevo (**Alvarez-Suarez et al., 2014**).

1.2.1.3 Miel de eucalipto

Es una miel monofloral que ha adquirido importancia en los últimos años y ha sido objeto de varios estudios. Para este tipo de miel el néctar se obtiene del árbol de eucalipto perteneciente a la familia *Myrtaceae*, denominado *Eucalyptus globulus*, es considerado como la materia prima fundamental en el proceso de producción de esta miel; se estima que existen alrededor de 800 especies de eucalipto en el mundo y una gran variedad de abejas hacen posible la producción de esta miel, adquiriendo a su vez un papel importante la estabilidad ecológica del planeta (**Bobis et al., 2020**).

Actualmente el eucalipto es utilizado de forma amplia para una gran variedad de propósitos, especialmente medicinales, como: antiinflamatorio, antimicrobiano, expectorante y analgésico. Por esta razón resulta fácil encontrarlo en diversas regiones del mundo especialmente en zonas cálidas, la miel de eucalipto es producida en gran porcentaje en Australia y América del Sur (**Bobis et al., 2020**).

- **Composición**

De forma general la miel se encuentra compuesta principalmente por agua, azúcares y en menor medida por compuestos como los flavonoides, proteínas, colorantes, minerales, fitoquímicos, ácidos orgánicos, polen, diversas vitaminas y una gran cantidad de compuestos aromáticos. La miel floral incluye varios compuestos de características antioxidantes entre los que se destaca la presencia de ácido ascórbico, catalasa, compuestos fenólicos, aminoácidos y derivados carotenoides (**Alshammari et al., 2022**).

Actualmente se describe una gran variedad de compuestos químicos existentes en la miel, los cuales varían debido a condiciones climáticas, situación geográfica y en especial su composición se ve afectada por las plantas de las que se fabrica esta sustancia (**Alshammari et al., 2022**).

- **Efecto antimicrobiano y antioxidante**

Se conoce que gran cantidad de las propiedades medicinales propias de ciertas plantas son capaces de transmitirse a través de la miel (**Alvarez-Suarez et al., 2014**). De manera particular el efecto antimicrobiano depende de varias condiciones y factores que intervienen en su fabricación; pero, también se puede ver afectado por malas prácticas en el transporte y almacenamiento (**Alvarez-Suarez et al., 2014**).

La miel posee efectos bactericidas los cuales son atribuidos en gran porcentaje a su alta osmolaridad, su acidez, contenido de agua relativamente bajo; (Morrone et al., 2018) destaca la producción de peróxido de hidrógeno gracias a la acción de la enzima glucosa oxidasa y demás componentes fitoquímicos. (Morrone et al., 2018).

La actividad antioxidante de la miel de eucalipto se debe principalmente a la presencia de compuestos como polifenoles, flavonoides y enzimas antioxidantes. Este tipo de elementos contribuyen a neutralizar los radicales libres, de esta manera protegen a las células del daño oxidativo. Por otro lado, la acidez natural propia de la miel y la capacidad que posee para generar peróxido de hidrógeno son también factores que contribuyen a sus propiedades antioxidantes (Alvarez-Suarez et al., 2014).

1.2.2 *Staphylococcus*

1.2.2.1 Definición

Se puede definir como un género de bacterias pertenecientes a la clase *bacilli*, que comprende una gran variedad de microorganismos los cuales se encuentran presentes en la piel o mucosa de mamíferos, aves y el ser humano (Rocchetti et al., 2018).

1.2.2.2 Características generales

Los *Staphylococcus* poseen características de fácil crecimiento en la mayor parte de medios bacteriológicos, en caso de realizar cultivos como medios de mayor crecimiento: manitol y agar sangre. Se los considera como cocos anaerobios facultativos, lo que posibilita supervivencia con o sin oxígeno, se ha descrito que poseen una alta velocidad de crecimiento en temperaturas que varían 25 y los 5 grados centígrados. Una de las principales diferencias a comparación de los estreptococos es la producción de catalasa,

enzima que se encarga de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno tanto en agua como en oxígeno (**Rocchetti et al., 2018**).

1.2.2.3 Factores de virulencia

Dentro de los factores de virulencia podemos destacar una estructura conformada por ácidos teicoicos, peptidoglucanos y ácidos lipoteicoicos. Los cuales le proporcionan características para adherirse a superficies externas y evadir los procesos de fagocitosis (**Rocchetti et al., 2018**). Existen varios factores de virulencia los cuales son útiles al momento de realizar una invasión y permiten su fácil identificación en el laboratorio, dentro de estos encontramos:

- La presencia de coagulasa, especialmente en el caso de *S. aureus*, acciones de fermentación del manitol.
- Se puede encontrar betalactamasa, la cual se encarga de romper el anillo betalactámico presente en la estructura de los antibióticos.
- La presencia de catalasa como factor de virulencia.

Cabe resaltar que el principal reservorio de este tipo de bacterias son las zonas secas como paredes cemento o concreto (**Rocchetti et al., 2018**).

1.2.3 *Staphylococcus coagulasa negativa (SCN)*

Forman parte del grupo de microorganismos que con mayor frecuencia son aislados en laboratorios dedicados a la microbiología. Pese a esto, la mayor parte del tiempo su significado clínico resulta complicado de establecer, debido a que en ciertas ocasiones

pueden ser comensales inofensivos y en otros patógenos invasores (**Fariña González et al., 2013**).

La relevancia de este grupo de bacterias, considerado especialmente como patógeno, ha crecido de forma paulatina llegando a reportarse como agentes etiológicos de bacteriemias que se encuentran relacionadas a diversas infecciones asociadas con: abscesos superficiales, ciertas infecciones cutáneas y de tejidos blandos, en casos muy concretos con infecciones oftalmológicas, complicaciones por infecciones postquirúrgicas y del tracto urinario (**Fariña González et al., 2013**).

Dentro de las especies que con más frecuencia se encuentran involucradas en diferentes patologías destacan: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. saprophyticus* mismos que son capaces de alcanzar hasta un 80% de los casos reportados; en menor medida encontramos a *S. lugdunensis*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. sciuri*, entre otros (**Fariña González et al., 2013**).

1.2.3.1 Virulencia de SNC

Hace referencia a la capacidad que poseen ciertas cepas para lograr expresar adhesinas y formar biopelículas, mejor conocido como slime, en diferentes objetos, en el caso de material de uso clínico ya sean dispositivos protésicos o catéteres, en cuyo interior los microorganismos son capaces de agregarse y así formar macrocolonias que a su vez crecen siendo protegidas de antimicrobianos, anticuerpos, y demás mecanismos de defensa pertenecientes al hospedero (**Fariña González et al., 2013**).

La formación de este tipo de biopelícula se llega a considerar como uno de los factores de virulencia más importantes en determinadas cepas de SCN, reportándose niveles de

dificultad superiores al erradicar infecciones crónicas que se encuentran asociadas a este proceso característico al igual que la constante asociación a una caída en los índices de susceptibilidad a la acción de antimicrobianos. Se conoce también que los SCN poseen la capacidad de sintetizar enzimas como es el caso de las lipasas, ADNasas, termonucleasas, hemolisinas y otras exoenzimas cuyo objetivo principal es degradar tejidos y alargar el tiempo de la infección (**Fariña González et al., 2013**).

1.2.4 *Mammaliococcus sciuri*

Se lo considera como una especie comensal que se encuentra presente en una gran variedad de hábitats mismos que incluyen animales, humanos y el medio ambiente en general. Entre sus características destaca su potencial patogénico y su capacidad para inducir infecciones tanto en animales como en humanos, de manera especial cuando existe depresión del sistema inmune, por lo cual se los llega a considerar como gérmenes de carácter oportunista. Actualmente se considera que *M. sciuri* es un reservorio gran cantidad de factores de virulencia y diversos genes que confieren resistencia antimicrobiana cruzada para otros *Staphylococcus* (**Han et al., 2017**).

Tabla 1. *Taxonomía de M. sciuri*

<i>Taxonomía</i>	
Dominio	<i>Bacteria</i>
Filo	<i>Bacillota</i>
Clase	<i>Bacilli</i>
Orden	<i>Bacillales</i>
Familia	<i>Staphylococcaceae</i>
Género	<i>Mammaliococcus</i>
Especie	<i>M. sciuri</i>

Fuente: (National Library of Medicine, 2020)

Ecuador en sus regiones tropicales: Costa, Amazonía y Región insular posee una amplia gama de ecosistemas con diversos tipos de animales y plantas. Las actividades relacionadas con la agricultura y ganadería crean un vínculo muy estrecho entre animales y cuidadores, de igual manera los alimentos poco higienizados aumentan la posibilidad de encontrar diferentes microorganismos. En varias zonas dedicadas a la producción láctea y cárnica ha sido posible identificar la presencia de *M. sciuri*, lo cual supone un problema para la salud pública (Han et al., 2017).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Determinar el efecto antimicrobiano de la miel de eucalipto a diferentes concentraciones en cultivos de *Mammalicoccus sciuri*

1.3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la miel de eucalipto desde el punto de vista físico y químico.
- Comprobar el efecto antimicrobiano de la miel de eucalipto utilizando el método de difusión en agar.
- Determinar el número de unidades formadoras de colonia a través de pruebas de dilución.

1.4 Hipótesis

- **Ho:** La miel de eucalipto no posee características antimicrobianas sobre *Mammaliicoccus sciuri*.
- **Ha:** La miel de eucalipto posee características antimicrobianas sobre *Mammaliicoccus sciuri*.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Ubicación del estudio

El presente estudio se llevó a cabo en dos lugares diferentes:

- Laboratorio de Ingeniería en Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito, Campus Cumbayá, misma que se encuentra ubicada en la ciudad de Quito, perteneciente a la provincia de Pichincha, Ecuador con las siguientes coordenadas: 0°13'12"S 78°30'45"O (**GetaMap, 2021**).
- Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, misma que se encuentra ubicada en el cantón Cevallos, perteneciente a la provincia de Tungurahua, Ecuador con las siguientes coordenadas: 1°22'5" Latitud Sur y 78°36'32" Latitud Oeste (**GetaMap, 2021**).

2.2 Características del Lugar

- Laboratorio USFQ

Tabla 2. *Características ambientales del Laboratorio USFQ.*

Parámetro	Valor
Clima	Primaveral cálido
Temperatura media promedio, °C	14 a 22
Humedad relativa, %	65 – 89
Velocidad del viento, m/s	1.8 – 7.9
Precipitación, mm	300-700

Fuente: (GADQuito, 2020).

- Laboratorio Microbiología UTA

Tabla 3. *Características ambientales del Laboratorio Microbiología UTA.*

Parámetro	Valor
Clima	Ecuatorial Meso Térmico Seco
Temperatura media promedio, °C	13 a 16
Humedad relativa, %	60-75
Velocidad del viento, m/s	2.1-8.9
Precipitación, mm	200-500

Fuente: (GADCevallos, 2020).

2.3 Materiales

Tabla 4. *Materiales*

Materiales de Laboratorio	
<ul style="list-style-type: none">• Cajas Petri• Gradillas• Tubos de ensayo• Cucharas de medición• Vasos de precipitación• Papel de Aluminio• Micropipetas• Puntas de micropipetas• Guantes de látex	<ul style="list-style-type: none">• Asas de siembra• Palillos de siembra• Mascarilla• Cofia• Zapatones• Mandil• Mecheros Bunsen• Cubetas para espectrofotómetro• Hisopos Estériles
Reactivos	
<ul style="list-style-type: none">• Agua destilada• Agar Müller Hilton• Medio líquido Cerebro-Corazón• Cloruro de Sodio	<ul style="list-style-type: none">• Agar Tripticasa de Soya• Agar Cerebro Corazón• Miel de eucalipto• Solución azucarada
Equipos	
<ul style="list-style-type: none">• Balanza Analítica• Autoclave• Incubadora• Espectrofotómetro	<ul style="list-style-type: none">• Microscopio• Nevera• Vórtex• Computador
Insumos de Oficina	
<ul style="list-style-type: none">• Marcadores indelebles• Esferos	<ul style="list-style-type: none">• Hojas de papel• Libreta de apuntes

Material biológico

- *Mammaliicoccus sciuri*, cepa MarR36
-

2.4 Factores de estudio

- *Mammaliicoccus sciuri*, cepa MarR36
- Miel monofloral de eucalipto
 - ✓ Tratamiento 1: miel de eucalipto al 5%
 - ✓ Tratamiento 2: miel de eucalipto al 10%
 - ✓ Tratamiento 3: miel de eucalipto al 15%
 - ✓ Tratamiento 4: miel de eucalipto al 20%
 - ✓ Tratamiento 5: miel de eucalipto al 25%

2.5 Análisis estadístico

2.5.1 Tamaño de la muestra

Se trabajó con *Mammaliicoccus sciuri*, cepa MarR36, crioconservada en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato, Campus Querochaca.

2.5.2 Diseño experimental

El presente trabajo de investigación consta de tres etapas.

Etapa 1: Se realizó la caracterización físico-química de la miel de eucalipto. Los datos obtenidos en esta etapa fueron cotejados con los diferentes parámetros y escalas previamente establecidos para cada una de las características a estudiar.

Etapa 2: Se comprobó efecto antimicrobiano de la miel de eucalipto a diferentes concentraciones sobre *M. sciuri* a través de pruebas de difusión en agar modificadas en pocillos; la variable a considerar la medida de los halos de inhibición.

Los resultados obtenidos en esta etapa al ser considerados como variables y cualitativos no presentan una distribución homogénea, es por esto que el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando pruebas no paramétricas como: Kruskal Wallis que se complementó con la prueba U de Mann Whitney.

Etapa 3: Se determinó la influencia de la miel de abeja y solución azucarada sobre las unidades formadoras de colonia Agar el cerebro corazón.

De los resultados obtenidos esta etapa se considerará como diferentes según la prueba de Mann Whitney para $p < 0,05$ aquellos rangos promedios partan letras en común en una misma columna.

2.6 Procedimiento

2.6.1 ETAPA 1. Análisis fisicoquímico de la miel de eucalipto

▪ Muestras

Las muestras de miel previamente identificada como monofloral de eucalipto se obtuvieron de las bodegas criogénicas de la Universidad San Francisco de Quito, dichas muestras a su vez pertenecen al apiario Api Real, que se encuentra ubicado en el Valle de los Chillos, Quito – Ecuador.

Estas muestras fueron procesadas y analizadas en el laboratorio de Ingeniería en Alimentos en la Universidad San Francisco de Quito, Campus Cumbayá.

2.6.1.1 Características físicas de la miel de eucalipto

▪ Conductividad Eléctrica

1. Disolver la miel de eucalipto en agua destilada, de preferencia previamente hervida, hasta completar un matraz aforado (25 ml).
2. Colocar esta solución en un vaso de precipitación cuya capacidad sea de 50 ml como mínimo y luego se posiciona el vaso en un baño termostático a 20° C.
3. Se introduce la celda para medida dentro de la solución de miel hasta alcanzar una temperatura de $20 \pm 0,5$ °C.
4. Una vez alcanzada la temperatura deseada se procede a tomar lectura del medidor portátil.

- **Humedad**

Para su determinar el porcentaje de humedad se utilizó el método AOAC 969.38B, el mismo que consiste en tomar lectura del índice de refracción de la miel y posteriormente obtener el valor haciendo uso de la tabla que se encuentra detallada en la norma INEN 1632 (INEN, 1988).

Esta normativa establece que la determinación se debe efectuar por duplicado sobre la muestra de miel previamente homogeneizada (INEN, 1988).

1. Se debe circular agua caliente por la camisa del refractómetro con el objetivo que el instrumento adquiriera una temperatura de 20 °C y nos permita tomar lecturas correctas.
2. Es necesario colocar una porción de la muestra previamente preparada (homogeneizar por agitación o mediante baño maría), entre los prismas del refractómetro.
3. Con la finalidad de mantener constante la temperatura del refractómetro como de la miel, se debe continuar con la circulación del agua caliente.
4. Finalmente, se observa y se toma nota de la lectura marcada por el refractómetro, así como, la temperatura del termómetro

(INEN, 1988).

- **Color**

Para realizar la detección del color se utilizó el ensayo espectrofotométrico descrito por **(Montenegro et al., 2005)**

1. Son necesarias soluciones acuosas miel de eucalipto, para obtenerlas se debe mezclar 5 gramos de miel de eucalipto con 10 ml de agua destilada.
2. Mantener esta solución en reposo al menos 15 minutos.
3. Finalmente se determina la absorbancia espectrofotométrica a 650 nm.

El color se expresó mediante la escala colorimétrica como mm PFund **(Montenegro et al., 2005)**.

- **Cenizas**

1. El estudio debe efectuarse por duplicado en la muestra previamente homogeneizada.
2. Se debe pesar de 5 a 10 g de la muestra para luego colocar en una cápsula de platino previamente tarada.
3. Evaporar la muestra utilizando baño de María entre 60 – 65 °C.
4. El residuo seco del paso anterior se debe calcinar en una mufla a una temperatura de 600 °C hasta obtener un peso constante y una evidente presencia de cenizas blanquecinas.
5. Por último, se debe enfriar en un desecador y tomar su peso con una aproximación de 0,1 miligramos.

- **pH**

La determinación del pH de la miel de eucalipto se debe efectuar por duplicado sobre la muestra previamente homogeneizada.

1. En un vaso de precipitación con un volumen mínimo de 250 cm³, tarar 10 gramos de la muestra homogeneizada.
2. Se debe diluir la muestra usando 75 cm³ de agua libre de CO₂.
3. Por último, agitar y determinar el pH de la solución usando un potenciómetro.

- **Hidroximetilfurfural (HMF)**

Para su determinación es recomendable efectuarse por duplicado sobre la muestra previamente homogeneizada.

1. En un vaso de precipitación se deben pesar 5 g de miel, para luego ser transferida a un balón aforado cuyo volumen sea de 50 cm³, con 25 cm³ de agua destilada aproximadamente.
2. Luego, añadir 0,50 cm³ de solución de ferrocianuro de potasio, mezclar y posterior añadir 0,50 cm³ de solución de acetato de zinc para después llevar hasta un volumen de 50 cm³ utilizando agua destilada.
3. Filtrar la solución resultante, pero desechar los primeros 10 cm³ del filtrado.
4. Con la ayuda de dos tubos de ensayo de 18 x 150 mm, se debe añadir a cada tubo 5 cm³ del filtrado obtenido en el paso anterior.
5. Al primer tubo se debe añadir 5 cm³ (muestra), y al segundo tubo (referencia), añadir 5 cm³ de NaHSO₃.

6. Se procede a determinar la absorbancia de la muestra patrón comparada con la obtenida de la muestra de referencia, configurando a 284 y 336 nm.
7. Utilizar la siguiente fórmula: $(HMF) 100 \text{ g de miel} = (A_{284} - A_{336}) \times 14,97 \times 5/\text{g muestra}$.

▪ **Azúcares Reductores**

El método empleado para determinar azúcares reductores es el de Lane-Eynon, que básicamente consiste en la reducción del complejo de cobre hasta un volumen determinado del reactivo de Fehling que debe encontrarse en ebullición, gracias a la adición de la muestra diluida de miel de eucalipto, se debe emplear azul de metileno como modelo indicador.

Todos los procesos y métodos utilizados para determinar azúcares reductores se encuentran detallados en la norma técnica ecuatoriana obligatoria (INEN 1633), especialmente la relación fructosa-glucosa presente en la miel (INEN, 1988).

▪ **Índice de diastasa**

El índice de diastasa se define como la cantidad, expresada en centímetros cúbicos, de una solución compuesta por almidón al 1 %, que es hidrolizada durante una hora por la enzima que se encuentra contenida en 1 g de miel. El método que se llevó a cabo para determinar este valor es el descrito por la norma técnica ecuatoriana obligatoria (INEN 1638), en donde se menciona que para calcular ID es necesario:

1. Realizar una representación gráfica de la absorbancia obtenida en función del tiempo (minutos). Posteriormente, se procede a trazar una línea recta a través del mayor número de puntos ubicados sobre la gráfica.

2. Se debe leer el tiempo de reacción que corresponde a la absorbancia de 0,235 para luego aplicar la ecuación: $ID = 300 / t$

(INEN, 1988).

- **Fenoles**

Para determinar el contenido de polifenoles totales se empleó el método descrito por (Pérez et al., 2008).

1. Como primer paso se tomó de 0,5 gramos de miel aproximadamente; para posterior agregar 25 μL del extracto.
2. Luego se procede a mezclar la solución obtenida con 450 μL de agua desionizada y además se adicionaron 1500 μL de la solución A, compuesta principalmente por (1 % de SDS, 0,4 % NaOH, 2 % de Na_2CO_3 , 0,16 % tartrato de sodio y potasio).
3. A la solución A, se le debe adicionar 1000 μL de CuSO_4 a una concentración del 4 %.
4. Esta mezcla debe ser incubada a 37 °C por un tiempo de 10 minutos.
5. Finalmente, se agregan 150 μL del reactivo Folin-Ciocalteu 0,2 N.
6. La absorbancia se mide a 750 nm y en este caso se trabajó con ácido gálico como estándar de referencia

2.6.2 ETAPA 2. Evaluación del efecto antimicrobiano

- **Muestras**

Se trabajó con muestras de *Mammaliicoccus sciuri cepa MarR36* fueron obtenidas del Laboratorio de Biología Molecular, mismo que se encuentra ubicado en la Facultad

de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, Campus Querochaca.

2.6.2.1 Protocolo de reactivación de muestras crioconservadas

Para reactivar la cepa se cultivó en agar tripticasa de soya utilizando el método de estriación escocés y posteriormente se incubó durante un período de 24 horas a 37 °C posicionando la caja petri de manera invertida (Flores Y Fernández, 2016).

2.6.2.2 Método de difusión en Agar modificado en pocillos

Una vez reactivada la cepa de *Mammaliococcus sciuri*, fue necesario realizar pruebas de tinción gram para descartar una posible contaminación bacteriana. Como segundo punto se realizó un cultivo, de 24 horas en agar tripticasa de soya, de aquellas muestras que se encontraron libres de contaminación.

Se tomó una colonia de *Mammaliococcus siuri* y se procedió a sembrar en caldo cerebro corazón a razón de 5 ml por cada tubo de ensayo, luego fueron incubados durante 3 horas a una temperatura de 37 °C para después estandarizarlos a 0,5 en la escala McFarland.

Luego haciendo uso de hisopos estériles se sembró el inóculo en agar Muller Hilton realizando estrías paralelas y compactas a fin de abarcar la mayor parte de la superficie del agar y se repitió este proceso rotando 45 grados la placa en tres oportunidades más, finalizando este proceso dejando secar durante 10 minutos para posteriormente realizar los pocillos utilizando una punta azul para micro pipeta, juegos se vertió pocillo un total de 50 uL de cada dilución realizada a la miel de eucalipto, dejando secar durante un período de 20 minutos y finalmente se incubó durante 24 horas a una temperatura de 37°C. Como último. Se realizó la lectura de sensibilidad midiendo los diámetros de inhibición del crecimiento bacteriano al igual que en el método Kirby-Bauer.

2.6.3 ETAPA 3. Número de unidades formadoras de colonia (UFC)

Para determinar el número de unidades formadoras de colonia fue necesario preparar placas con agar cerebro corazón y dejarlas secar durante 48 horas, a su vez se refrescó la cepa de *Mammaliicoccus sciuri* en agar trépticasa de soya, con un cultivo menor a 24 horas de incubación.

Luego se procedió a combinar las diluciones previamente establecidas de miel de eucalipto junto con caldo cerebro corazón, a fin de obtener un volumen total de 3 ml por cada tubo. Realizar el proceso antes mencionado, pero combinarlo con las diluciones correspondientes a la solución azucarada. De forma simultánea se inoculó la cepa bacteriana en caldo cerebro corazón a razón de 5 ml hasta obtener una absorbancia igual a 0,5. De este inóculo se tomaron 100 uL para depositarlos en cada tubo.

Para realizar las diluciones seriadas, se colocaron 4,5 ml de solución salina a las que se añadieron 500 uL de la solución correspondiente a la miel de abeja diluida combinada con el caldo cerebro corazón y la cepa bacteriana.

Por último, en las placas compuestas por agar cerebro corazón, se colocaron 1000 uL de la dilución correspondiente a (1/32) y se procedió a homogeneizar utilizando perlas de cristal estériles, se incubó durante 24 horas 37 °C y se procedió a realizar el conteo de UFC, de igual manera se tomó lectura de la absorbancia correspondiente a cada dilución.

2.6.4 Crecimiento bacteriano en medio líquido

Para evaluar el crecimiento bacteriano en medio líquido fue necesario determinar la absorbancia por espectrofotometría.

1. Refrescar la cepa bacteriana *M. sciuri* inhalar tripticasa de soya, con un cultivo menor a 24 horas de incubación.
2. Combinar las diluciones previamente establecidas de miel de eucalipto con caldo cerebro corazón, a fin de obtener un volumen total de 3 ml por cada tubo.
3. Combinar las diluciones previamente establecidas de solución azucarada junto con caldo cerebro corazón hasta obtener un volumen total de 3ml por tubo
4. Preparar el inóculo de la cepa bacteriana cerebro corazón hasta obtener una absorbancia igual a 0,5.
5. Del inóculo preparado en el paso anterior se deben tomar 100 microlitros depositarlos en los tubos con las diluciones correspondientes.
6. Homogeneizar los tubos a fin de obtener mejores resultados.
7. Se procede a incubar los tubos durante 24 horas a 37 °C
8. Transcurridos las 24 horas se procede a determinar la absorbancia espectrofotométrica para la miel y solución azucarada.

2.7 Variable respuesta

La dilución mínima activa de la miel, en cuanto a propiedades antimicrobianas se refiere, es aquella concentración mínima de miel que resulta necesaria para demostrar actividad antimicrobiana frente a ciertos patógenos. La dilución mínima activa puede variar de acuerdo al tipo de miel y la bacteria o microorganismo al que se enfrente. De igual manera, este efecto se ve reflejado en la inhibición de crecimiento bacteriano (**Fernández Andreu et al., 1999**).

2.8 Tratamientos

Por cada tratamiento se realizarán 3 siembras en Agar Müller-Hinton, que corresponden a un total de 21 placas, mismas que serán sometidas al conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) utilizando el método de espectrofotometría; donde se obtendrá una media del número de UFC por cada tratamiento.

2.9 Procesamiento de la información

Los datos recolectados como resultado de esta investigación serán registrados en el programa Excel, a continuación, se realizará un análisis exploratorio correspondiente a los datos obtenidos de cada variable, si poseen una distribución heterogénea se utilizará la prueba de Kolmogorov smirnov; en caso de presentar homogeneidad de varianza, se utilizará la prueba de Levene.

Para aquellos datos que cumplan con ambos criterios se empleará la prueba ANOVA de clasificación simple; mientras que para la separación de medias se utilizará la prueba de Tukey. Por otro lado, para aquellos datos que no cumplan con los criterios previamente establecidos se empleará la prueba de kruskal wallisc, complementada con el Test de Mann Whitney.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización fisicoquímica de la miel de eucalipto

- **Conductividad eléctrica**

La conductividad eléctrica de la miel de eucalipto fue de 0,64 mS/cm (milisiemens por centímetro).

En el trabajo descrito por **(Factory, 2004)** establece a la conductividad eléctrica como un parámetro que se encuentra principalmente relacionado con el contenido de sales minerales, proteínas y ácidos orgánicos, resulta útil al momento de establecer el origen geográfico. Por otra parte, actualmente se sugiere como una técnica que de forma indirecta se utiliza para determinar composición mineral de diferentes tipos de mieles, pues se conoce que este parámetro varía de forma significativa durante su almacenamiento. El rango esperado en la miel oscila entre los 0,60 y 2,17 mS/cm, que encaja con los datos obtenidos en el presente estudio **(Factory, 2004)**.

Por otro lado, en el trabajo realizado por **(Ortega-Bonilla, 2016)** se menciona que la miel posee una gran cantidad de iones inorgánicos, al igual que aminoácidos y ciertos ácidos de origen orgánico; por esta razón, posee la capacidad de conducir la corriente eléctrica al momento de aplicar un campo eléctrico haciendo posible medir y cuantificar este parámetro conocido como conductividad eléctrica. Además, aporta datos que permiten identificar sus diferentes orígenes y diferenciar aquellas mieles florales que poseen valores entre 0,1 y 0,7 mS/cm de las mieles que provengan de mi helada o de castaño las cuales presentan valores superiores a 1 mS/cm **(Ortega-Bonilla, 2016)**

La conductividad eléctrica se convierte en un dato usado para principalmente para diferenciar mieles de orígenes variados, en el estudio realizado por **(Bogdanov, 1996)** se menciona que la miel de mielada y la procedente del castaño por lo general presentan conductividad eléctrica superior a 1 mS/cm, por otro lado, las mieles florales presentan valores entre 0,1 y 0,7 mS/cm.

Los resultados obtenidos por **(Aira et al., 1996)** referentes a conductividad eléctrica de gran variedad de mieles revelan valores extremadamente variables. Es así que para mieles florales se han descrito datos comprendidos en una escala entre 181 y 1127 $\mu\text{S/cm}$ y, por otro lado, para la miel de mielada estos valores se encuentran entre 1220 y 1624 $\mu\text{S/cm}$ **(Aira et al., 1996)**

▪ **Humedad**

Se determinó un porcentaje de humedad del 14,8 %, que se encuentra dentro de las normas para la miel aprobadas por (Norma INEN NTE 1572 1988-04), las cuales indican que debe ser inferior al 20 %.

Los resultados obtenidos en este estudio se relacionan con los obtenidos por **(García et al., 2022)** en dónde los valores reportados para el porcentaje de humedad perteneciente a mieles melíferas se encuentran en un rango de 14 al 22 %.

En el estudio realizado por **(Ulloa, 2010)** se describe al contenido de humedad como una de las características fundamentales en la composición de la miel, esta depende de varios factores como por ejemplo el ambiente y la humedad del néctar. Describe además que la miel madura posee un porcentaje de humedad menor o igual al 18.5 %, si este porcentaje es rebasado, la miel tiende más susceptible a procesos de fermentación. Además, se menciona que el contenido de agua en la miel posee gran influencia en su viscosidad, color y peso específico **(Ulloa, 2010)**.

- **Color**

Una vez aplicado el método de espectrofotometría para determinar el color de la miel, se pudo obtener un valor de 50,4 mmPFund, que de acuerdo a la escala de color de determinó que la miel de eucalipto posee un color ámbar claro.

El estudio de las características físicas miel adquiere gran importancia debido a varias razones, principalmente porque posibilita una orientación hacia el origen botánico de la miel. De acuerdo a lo descrito por (**Fattori, 2004**), se describe como mieles color ámbar claro cuando se encuentran entre los 50,01 y 85.0 mmPFund, de igual manera menciona que los colores enmarcados en tonalidades claras se encuentran asociadas con flavors más delicados y aquellas mieles que poseen colores más oscuros se les relaciona con flavors más fuertes y su apariencia por lo general tiende a ser menos atractiva.

Este resultado es similar al realizado por (**Fattori, 2004**) en dónde menciona que algunos colores tienden a ser características de cada variedad floral, como es el caso de la miel de eucalipto en la que predominan tonalidades entre el color ámbar claro y oscuro, de igual manera se describe como una miel características compactas cuyos cristales finos favorecen a un sabor más ácido.

- **Cenizas**

El resultado obtenido para contenido de cenizas es de 0,46 % en masa, que se encuentra dentro de los valores considerados dentro del estándar emitido por (Norma INEN NTE 1572 1988-04) que menciona valores de ceniza menores máximo del 0,5%.

- **pH**

Se determinó que el pH de la miel de eucalipto es de 5.43, siendo una miel considerada como acida lo que aumenta su capacidad antimicrobiana.

Tanto el pH como la acidez son dos valores te posibilitan la clasificación de acuerdo al origen tanto geográfico como botánico de la miel, el pH por lo general es un parámetro correlacionado con el origen floral de la miel, es así que un pH ácido entre 3.5 y 5.5 es característico de una miel floral; mientras que un pH más alcalino por lo general proviene de la mielada, su pH en cambio se encuentra en un rango superiores a 5,5 (**Fattori, 2004**).

Estos resultados se asemejan a los obtenidos en el estudio realizado por (**Ulloa, 2010**) en donde se menciona que los ácidos orgánicos son los principales responsables de un pH ácido en la miel, el cuál varía entre 3.5 y 5.5. Existen diversos ácidos orgánicos que se pueden encontrar en la composición de la miel, pero el ácido glucónico es el que predomina, este se origina a partir de la glucosa gracias a la acción en la glucosa oxidasa que es una enzima añadida por las abejas. Es gracias a su acidez y a la acción del peróxido de hidrógeno que se puede conservar características antimicrobianas en la miel. No obstante, en menor medida encontramos ácidos orgánicos como: butírico, oxálico, alfa-cetoglutárico, tartárico, acético, cítrico, entre otros (**Ulloa, 2010**).

- **Hidroximetilfurfural (HMF)**

El resultado obtenido para la miel de eucalipto fue de 11,83 mg HMF/kg miel, que se encuentra dentro de los parámetros establecidos para HMF por (Norma INEN NTE 1572 1988-04).

Realizado por **(Jiménez, 2016)** menciona que aquellos compuestos que se generan posterior a un proceso térmico en ciertas ocasiones se convierte en un riesgo potencial, de estos compuestos el más representativo es el hidroximetilfurfural HMF el cual se describe como un parámetro que indica la calidad de una muestra de miel, su aparición se da de forma repentina y natural, además se conoce que su concentración aumenta paulatina, esto debido a factores como tratamientos térmicos o temperaturas de almacenamiento inadecuadas, lo que a su vez genera que HMF se considere como un compuesto tóxico para nuestro organismo.

- **Índice de diastasa**

El resultado correspondiente al índice de diastasa para la miel de eucalipto fue de 22,71°S (grados Schade). Lo que indica un valor normal pues el índice mínimo contemplado por (Norma INEN NTE 1572 1988-04) es de al menos 9°S.

- **Fenoles**

El resultado obtenido para el contenido de Fenoles presentes en la miel de eucalipto fue 80,15 GAE/100 g de miel.

En el estudio realizado por **(García-Tenesaca et al., 2018)** se menciona que los compuestos fenólicos que se encuentran presentes en la composición de la miel son clasificados por lo general como metabolitos secundarios, esto pues de forma natural son sintetizados por las plantas con la finalidad de protegerse especialmente contra el estrés oxidativo, es de esta manera se transfieren estas propiedades a la miel medio del néctar.

En otro estudio realizado por **(Angarita y Cobos, 2017)** se describe que la miel de eucalipto de diferentes países a nivel mundial muestra valores para compuestos fenólicos

que oscilan entre 11,29 y 83,86 GAE/100g, que se correspondería con los resultados obtenidos en el presente estudio manteniéndose dentro del estándar.

- **Flavonoides**

El resultado obtenido para contenido de flavonoides presentes en la miel de eucalipto, fue de 1,49 mg QE/100 g.

En cuanto a los flavonoides (**Valdés-Silverio, 2018**) menciona que su estructura nuclear se encuentra unida gracias a dos anillos de benceno y a su vez estos se encuentran unidos gracias a la acción de un anillo de pirano, lo que favorece su clasificación en flavonoles, flavanonas y flavonas que se pueden diferenciar de acuerdo al tipo de grupo químico que se encuentre presente en el anillo. Además, describe que los principales flavonoides que se encontraron presentes en la miel de eucalipto, sometida a estudio en diferentes países, fueron: quercetina, catequina, apigenina, miricetina, luterolina y pinocembrina.

Por otro lado (**Muñoz, 2014**) en su estudio demuestra que, dentro de los resultados obtenidos sobre el contenido de flavonoides, el mayor es de 3,83 mg QE/100 g perteneciente a muestras de miel multifloral procedentes de Piura, se menciona además que para el eucalipto se obtuvo un contenido de flavonoides de 3,63 mg QE/100 g, en tanto que las mieles que estadísticamente obtuvieron un menor contenido de flavonoides totales fueron las de algarrobo y zapote.

3.2 Pruebas de difusión en agar modificado con pocillos

Tabla 5. Rangos promedio de diferentes diluciones de miel de eucalipto sobre *Mammaliicoccus sciuri*

Tratamientos	Rangos promedios
Miel al 5% (v/v)	2,00 c
Miel al 10% (v/v)	5,00 b
Miel al 15% (v/v)	9,50 a
Miel al 20% (v/v)	11,00 a
Miel al 25% (v/v)	12,50 a

En una misma columna rangos promedios que no compartan letras comunes son diferentes según la prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$.

La tabla muestra una comparación entre diferentes diluciones de miel de eucalipto sobre *Mammaliicoccus sciuri*, a fin de encontrar la dilución más baja a la que se inhibe el crecimiento bacteriano (MAD). De esta manera se determinó que *M. sciuri* demostró ser sensible a la miel de eucalipto con un valor MAD de 15% v/v.

Los resultados obtenidos se relacionan con los reportados por otros autores, como es el caso de (Alvarez- Suarez et al., 2010) en donde *S. aureus* fue el microorganismo considerado como más sensible, pues presentó un valor medio de MAD (4% v/v), por otro lado, *P. aeruginosa* presentó un valor de MAD (11% v/v). Otras bacterias como: *B subtilis* y *E. coli* resultaron ser moderadamente sensibles al efecto antimicrobiano que presenta la miel. De esta manera (Alvarez- Suarez et al., 2010) menciona que, de forma

general, las bacterias Gram positivas suelen ser más sensibles al efecto antimicrobiano de la miel en comparación a las bacterias Gram-negativas.

La actividad antimicrobiana de la miel se ha relacionado previamente con sus propiedades osmóticas, al igual que el contenido de peróxido de hidrógeno y el bajo pH, así como sustancias como el péptido defensina-1 de abeja y por el contenido de polifenoles (Alvarez-Suarez et al., 2013). Los resultados de este trabajo coinciden con los obtenidos por Cooper et al. (2002), en donde también se determinaron bacterias sensibles a la miel de manuka y miel de pasto.

La susceptibilidad que presentan ciertos patógenos a la miel se ha demostrado en otros estudios en los que se ha utilizado mieles de diferentes regiones geográficas y de orígenes florales distintos. En el estudio realizado por (Da Silva, 2016), la miel de madroño al 25% v/v presentó inhibición significativa de crecimiento bacteriano para cepas de SARM. Además, fue posible identificar actividad anti-biofilm, anti-inflamatoria y un considerable deterioro de la virulencia en cepas de *S. aureus* y SARM (Da Silva, 2016)

Es así que las mieles portuguesas mostraron un notable efecto antimicrobiano no sólo inhibiendo el crecimiento bacteriano, sino también llegando a afectar propiedades importantes para su patogenicidad, especialmente la virulencia y adherencia (Da Silva, 2016). Los resultados arrojados por estas investigaciones fueron similares a los obtenidos en este estudio, pese a haberse llevado a cabo en diferentes condiciones experimentales.

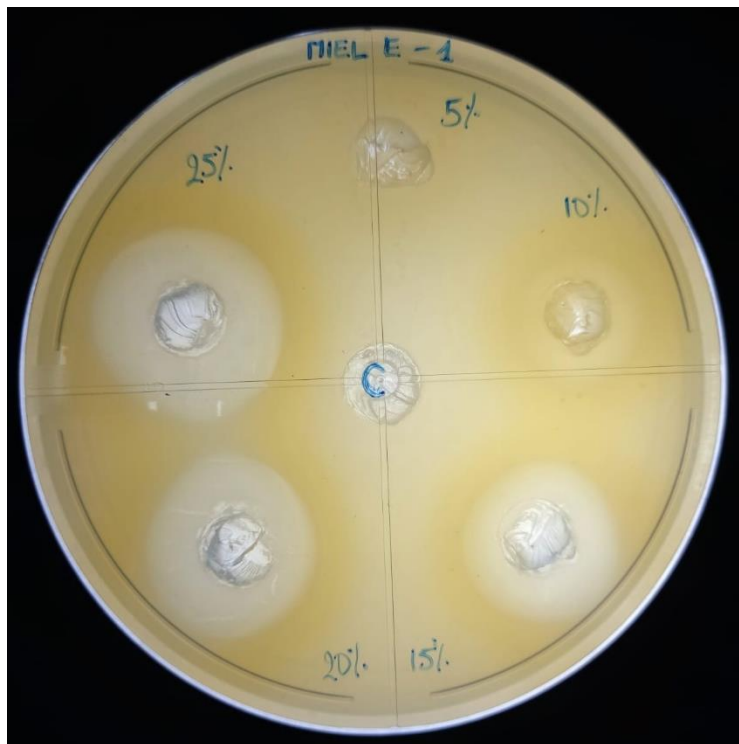


Figura 1. Halos de inhibición (Miel de Eucalipto)

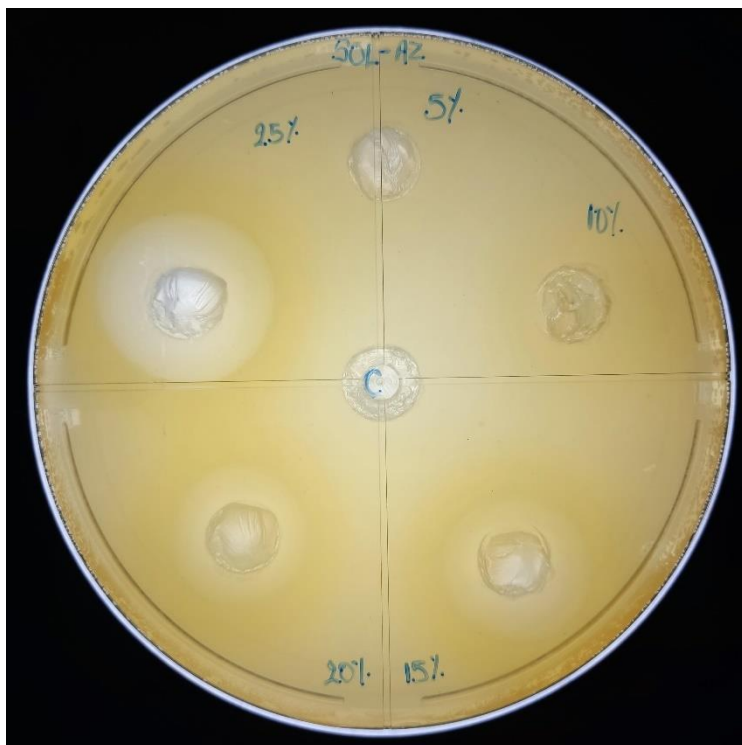


Figura 2. Halos de inhibición (Solución Azucarada)

3.3 Conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC)

Tabla 6. Influencia de la miel de abeja y solución azucarada sobre UFC en el medio de cultivo Agar Cerebro Corazón.

Tratamientos	X	Rangos promedios
Miel	$3,85 \times 10^6$	136,50 b
Solución azucarada	$6,42 \times 10^6$	328,50 a

En una misma columna rangos promedios que no compartan letras comunes son diferentes según la prueba de Mann Whitney para $p < 0,05$.

Al realizar un recuento del número de unidades formadoras de colonia para *M. sciuri* se encontraron los siguientes rangos promedio: para la miel de eucalipto de 136,50 (b), mientras que para la solución azucarada el rango promedio obtenido fue de 328,50 (a) de esta manera se determinaron diferencias significativas entre la acción antimicrobiana de la miel de eucalipto a comparación con una solución azucarada, siendo esta última menos efectiva en cuanto a su acción antimicrobiana.

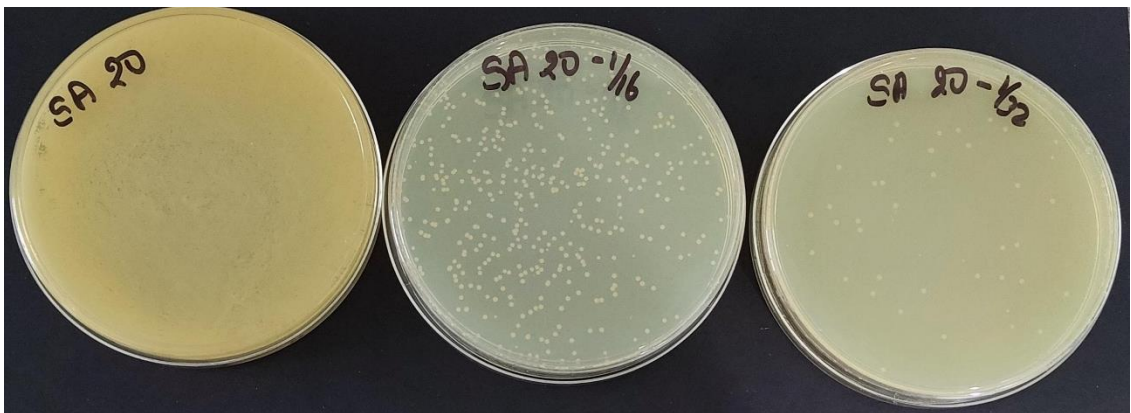


Figura 3. Conteo de UFC utilizando miel de eucalipto al 20%.

La actividad antimicrobiana que posee la miel liderada como una de sus características biológicas de mayor relevancia, de acuerdo a un estudio realizado por **(Díaz Rojas, 2017)** se estima que los principales factores que se encuentran relacionados con esta actividad son: una alta concentración de azúcar en la miel que provoca una alta molaridad, de igual manera se menciona el papel fundamental que juega el pH y la acidez y por último se establece la acción peróxido de hidrógeno **(Alvarez-Suarez et al., 2010)**.

Además, existen componentes que, aunque en menor medida se encuentran estrechamente relacionados con la actividad antimicrobiana como los ácidos fenólicos, flavonoides y de manera especial se menciona la defensina-1 **(Alvarez-Suarez et al., 2010)**.

Los resultados obtenidos en el presente estudio se relacionan con los obtenidos por **(Aguilera, 2009)** quién menciona que la habilidad que poseen las bacterias para sobrevivir al efecto antimicrobiano de la miel tiende a ser muy variable, esto debido a que cada miel contiene diferentes factores antimicrobianos que dependen a su vez de su origen ya sea geográfico o botánico, además menciona importancia de aplicar buenas prácticas agrícolas y de manipulación durante el procesamiento de las muestras.

La investigación realizada por **(Fangio et al., 2007)** señala que las muestras de miel obtenidas del estado de Trujillo pasas de inhibir el crecimiento bacteriano para bacterias como *S. aureus*, aplicando métodos como difusión en agar usando miel pura y diluida al 50%. Por otro lado, se determinó en estudios realizados con mieles zulianas que la bacteria más susceptible a este efecto fue *Pseudomona aeruginosa* **(Fangio et al., 2007)**.

3.4 Crecimiento bacteriano en medio líquido

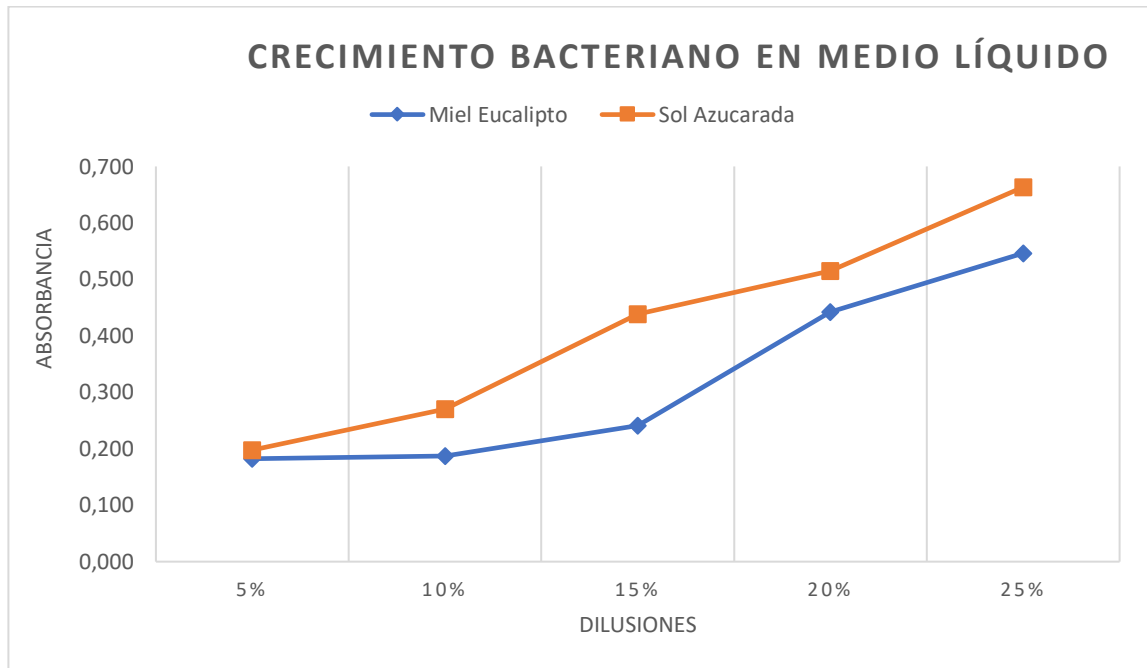


Figura 4. Crecimiento bacteriano en medio líquido

La Figura 4 muestra la media de tres repeticiones obtenidas al medir la absorbancia de diferentes diluciones pertenecientes a miel de eucalipto y solución azucarada sobre *M. sciuri*, demostrando que existe una mayor turbidez en cada una de las diluciones correspondientes a la solución azucarada, lo que se traduce en un mayor crecimiento bacteriano, al contrario de los resultados obtenidos en la miel de eucalipto en donde los valores de absorbancia son menores, demostrando una evidente acción antimicrobiana.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, fue posible caracterizar la miel de eucalipto a nivel fisicoquímico, enmarcándola como una miel monofloral de color ámbar claro, con valores referentes a humedad, actividad eléctrica y cenizas dentro de los mencionados en la literatura; un pH relativamente ácido, se destaca en su composición el contenido de fenoles y flavonoides como agentes antioxidantes que proveen un efecto antimicrobiano.
- Se comprobó el efecto antimicrobiano que posee la miel de eucalipto sobre *M. sciuri* con base en el método de difusión en agar modificado en pocillos, pues fue posible observar halos de inhibición de crecimiento bacteriano para este microorganismo en diluciones superiores o iguales al 15%.
- El número de unidades formadoras de colonia se vio reducido por el efecto antimicrobiano atribuido a la miel de eucalipto al determinarse un valor promedio de unidades formadoras de colonia de 3.85×10^6 UFC x ml, a comparación del valor obtenido con el uso de una solución azucarada como antimicrobiano que fue $6,42 \times 10^6$ UFC x ml, evidenciando así que *M. sciuri* coloniza con relativa facilidad ante los escasos efectos de la solución azucarada.

4.2 Recomendaciones

- Se recomienda evaluar los niveles de peróxido de hidrógeno para profundizar en el análisis antimicrobiano atribuido a la miel de eucalipto.
- Desarrollar investigaciones para los distintos tipos de miel hallados en el Ecuador.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aira, M. J., Horn, H., & Seijo, M. C. (1998) Palynological analysis of honeys from Portugal, *Journal of Apicultural Research*, 37:4, 247-254.
<https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100979>
- Alshammari, G. M., Ahmed, M. A., Alsulami, T., Hakeem, M. J., Ibraheem, M. A., & Al-Nouri, D. M. (2022). Phenolic Compounds, Antioxidant Activity, Ascorbic Acid, and Sugars in Honey from Ingenious Hail Province of Saudi Arabia. *Applied Sciences (Switzerland)*, 12(16), 8334. <https://doi.org/10.3390/app12168334>
- Alvarez-Suarez, J. M., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T. Y., Mazzoni, L., & Giampieri, F. (2014). The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. *Foods (Basel, Switzerland)*, 3(3), 420–432.
<https://doi.org/10.3390/foods3030420>
- Alvarez-Suarez, J., Giampieri, F., & Battino, M. (2013). Honey as a source of dietary antioxidants: structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. *Current medicinal chemistry*, 20(5), 621-638.
<https://doi.org/10.2174/092986713804999358>
- Angarita, L.X., & Cobos, D.M. (2017). Estudio Cromatográfico por HPLC-UV, Cuantificación de Fenoles, Flavonoides y Evaluación de la Capacidad Antioxidante en Miel de Abejas. Proyecto Curricular De Licenciatura En Química Universidad Distrital Francisco José De Caldas.
- Bobis, O., Moise, A. R., Ballesteros, I., Reyes, E. S., Durán, S. S., Sánchez-Sánchez, J., Cruz-Quintana, S., Giampieri, F., Battino, M., & Alvarez-Suarez, J. M. (2020). Eucalyptus honey: Quality parameters, chemical composition and health-promoting properties. *Food Chemistry*, 325, 126870.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126870>
- Bogdanov S, Vit P, Kilchenmann V. (1996). Sugar profiles and conductivity of stingless bee honeys from Venezuela. *Apidologie*, 27(6):445-50.
<http://dx.doi.org/10.1051/apido:19960602>
- Carrión Castillo, K. A. (2016). *Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de la miel*

de abeja de la sierra y costa ecuatoriana ante cepas de estreptococo mutans.
Trabajo de titulación previo la obtención del grado Académico de Odontóloga.
Carrera de Odontología. Quito: Universidad Central del Ecuador.
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/5752>

- Contreras-Martínez, C. S., Macías-Nieves, J. P., García-González, J. M., Trejo-Guardado, V. I., & Carranza-Concha, J. (2020). Antioxidant capacity and phenolic content of bee honey produced in Zacatecas, Mexico. *Revista fitotecnia mexicana*, 43(4), 453-460. <https://doi.org/10.35196/rfm.2020.4.453>
- Cordova-Cordova, C. I., Ramirez-Arriaga, E., Martínez-Hernández, E., & Zaldívar-Cruz, J. M., (2013). Caracterización botánica de miel de abeja (*Apis mellifera L.*) de cuatro regiones del estado de Tabasco, México, mediante técnicas melisopalinológicas. *Universidad y ciencia*, 29(2), 163-178.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792013000200006&lng=es&tlng=es.
- Da Silva, C. I., Aazza, S., Faleiro, M. L., Miguel, M. D. G., & Neto, L. (2016). The antibacterial, anti-biofilm, anti-inflammatory and virulence inhibition properties of Portuguese honeys. *Journal of Apicultural Research*, 55(4), 292-304.
<https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1243294>
- Díaz Rojas, M. A. (2018). *Estudio de la capacidad de la miel de aguacate para reducir in vitro biopelículas bacterianas en cepas de Staphylococcus Aureus y Klebsiella Pneumoniae como posible alternativa en el tratamiento de heridas de interés veterinario* , Trabajo de titulación previo la obtención del grado Académico en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Quito: Universidad de las Américas.
<http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/8957>
- Fangio, M., Iurlina, M., & 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), 120-123
- Fariña González, N., Carpinelli, L., Samudio, M., Guillén, R., Laspina, F., Sanabria, R., Abente, S., Rodas, L., González, P., & De Kaspar, H. M. (2013). Staphylococcus coagulasa-negativa clínicamente significativos. Especies más frecuentes y factores de virulencia. *Revista chilena de infectología*, 30(5), 480-488.

<https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000500003>

- Fattori, S.B. (2004). “La miel” propiedades, composición y análisis físico- químico. Beekeeping Technology and Bee Products Commission, 1-243.
- Fernández Andreu, C., Pimentel Turino, T., Martínez Machín, G., & González Miranda, M. (1999). Determinación de la concentración mínima inhibitoria de fluconazol frente a *Cryptococcus neoformans*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 51(1), 55-57. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07601999000100010
- Flores, V., & Fernandez, C. (2016). Protocolo de crioconservación de cepas bacterianas. *Instituto Del Mar Del Perú. Ciencia y Tecnología*, 1, 2-8.
- García, M.E., Armenteros-Rodríguez, E., Escobar-Álvarez, M., García-Chaviano, J., Méndez-Martínez, J., & Ramos-Castro, G. (2022). Composición química de la miel de abeja y su relación con los beneficios a la salud. *Revista Médica Electrónica*, 44(1), 155-167. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242022000100155&lng=es&tlng=es.
- García-Tenesaca, M., Navarrete, E. S., Iturralde, G. A., Villacrés Granda, I. M., Tejera, E., Beltrán-Ayala, P., Giampieri, F., Battino, M., & Alvarez-Suarez, J. M. (2018). Influence of Botanical Origin and Chemical Composition on the Protective Effect against Oxidative Damage and the Capacity to Reduce In Vitro Bacterial Biofilms of Monofloral Honeys from the Andean Region of Ecuador. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1). 45. <https://doi.org/10.3390/ijms19010045>
- Han, J. E., Lee, S., Jeong, D. G., Yoon, S. W., Kim, D. J., Lee, M. S., Kim, H. K., Park, S. K., Kim, J. H., & Park, S. C. (2017). Complete genome sequence of multidrug-resistant *Staphylococcus sciuri* strain SNUDS-18 isolated from a farmed duck in South Korea. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 11, 108–110. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.09.013>
- INEN. (1988). Miel de abeja. Requisitos. Documento Edicto NTE INEN de la República del Ecuador. Por Acuerdo Ministerial No. 214 del 1989-05-10. 8 (1- 4).
- Jiménez, V. H. (2016). Evaluación de Hidroximetilfurfural en diferentes marcas de Miel de Abeja, comercializadas en un Supermercado de Guayaquil. Tesis de Mestría.

- Univarsidad de Guayaquil. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/12966>
- Montenegro, G., Gómez, M., Pizarro, R., Rizzardini, G., & Ortega, X. (2005). Miel de abejas-denominación de origen botánico mediante ensayo melisopalinológico. Instituto Nacional de Normalización de Chile y Unidad de Botánica, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago.
- Morróni, G., Alvarez-Suarez, J. M., Brenciani, A., Simoni, S., Fioriti, S., Pugnaroni, A., Giampieri, F., Mazzoni, L., Gasparini, M., Marini, E., Mingoia, M., Battino, M., & Giovanetti, E. (2018). Comparison of the antimicrobial activities of four honeys from three countries (New Zealand, Cuba, and Kenya). *Frontiers in Microbiology*, 9, 1378. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01378>
- Muñoz, A. M., Alvarado-Ortíz C., Blanco Blasco T., Castañeda Castañeda, B., Ruiz Quiroz, J., & Alvarado Yarasca, A. (2014). Determinación de compuestos fenólicos, flavonoides totales y capacidad antioxidante en mieles peruanas de diferentes fuentes florales. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 80(4), 287-297. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2014000400008&lng=es&tlng=es.
- Ortega-Bonilla, R. A., Chito-Trujillo, D. M., Suárez-Ramos, C. A. (2016) Physicochemical characteristics of commercial eucalyptus honeys from Southwest Casanare. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 17(1):73-80 <https://revistacta.agrosavia.co/index.php/revista/article/view/462/379>
- Pérez, M. (2018). Análisis Palinológico de la miel de Apis Mellifera L., producida en el altiplano del Estado de Puebla, México. *Agro Productividad*, 11(3). 87-98 <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/223>
- Pozo Yépez, G. M. (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*. Trabajo de titulación previo la obtención del grado Académico en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Quito: Universidad de Las Américas. <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/5390>
- Proaño Artieda, A. (2020). *Influencia del tratamiento térmico en la capacidad*

antimicrobiana de la miel de eucalipto de la provincia de Pichincha, Ecuador.

Trabajo de titulación previo la obtención del grado Académico en Ingeniería en Biotecnología. Quito: Universidad de Las Américas.

<http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/12244>

- Rocchetti, T. T., Martins, K. B., Martins, P. Y. F., Oliveira, R. A. de, Mondelli, A. L., Fortaleza, C. M. C. B., & Cunha, M. L. R. S. (2018). Detection of the *mecA* gene and identification of *Staphylococcus* directly from blood culture bottles by multiplex polymerase chain reaction. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 22(2), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.02.006>
- Ulloa, A., Mondragón, P., Rodríguez, R. & Reséndiz, J. (2010). La miel de abeja y su importancia. *Revista Fuente* 2(4), 11-18. https://doi.org/10.1007/978-3-642-35125-9_6.
- Valdés-Silverio, L. A., Iturralde, G., García-Tenesaca, M., Paredes-Moreta, J., Narváez-Narváez, D. A., Rojas-Carrillo, M., Narvaez, D., Tejera, E., Beltrán-Ayala, P., Giamperi, F., & Alvarez-Suarez, J. M. (2018). Physicochemical parameters, chemical composition, antioxidant capacity, microbial contamination and antimicrobial activity of Eucalyptus honey from the Andean region of Ecuador. *Journal of Apicultural Research*, 57(3), 382-394.

ANEXOS

Anexo1. Datos informativos

Nombre del productor	René Gutierrez
Apiario	El eden de angamarca
Contacto	593 985 004 043 api.real@gmail.com
Floración	Eucalipto

Anexo 2. Evaluación de la Conductividad eléctrica

Muestra	Replica 1	Replica 2	Media	SD	SD %
Unidad	(mS/cm)	(mS/cm)	(mS/cm)		
2,1	0,551	0,553	0,552	0,00141	0,14%
2,2	0,581	0,584	0,583	0,00212	0,21%
2,3	0,521	0,526	0,524	0,00354	0,35%
2,4	0,665	0,659	0,662	0,00424	0,42%
2,5	0,710	0,709	0,710	0,00071	0,07%
2,6	0,701	0,694	0,698	0,00495	0,49%
2,7	0,681	0,68	0,681	0,00071	0,07%
2,8	0,690	0,692	0,691	0,00141	0,14%
2,9	0,680	0,677	0,679	0,00212	0,21%
2,10	0,669	0,671	0,670	0,00141	0,14%
2,11	0,689	0,691	0,690	0,00141	0,14%

Anexo 3. Evaluación de humedad

Muestra	Crisol vacío	Crisol + Muestra	Crisol +Muestra Estufa	% Humedad		SD %	Promedio
Unidad	g	g	g	%	%	%	%
2,1	38,44	39,56	39,36	82,14	17,86	0,73	17,63
	35,96	37,14	36,94	83,05	16,95		
	32,06	33,11	32,92	81,90	18,10		
2,2	35,82	36,92	36,73	82,73	17,27	12,12	15,71
	36,64	37,7	37,52	83,02	16,98		
	38,08	39,09	38,96	87,13	12,87		
2,3	31	32,05	31,87	82,86	17,14	22,00	14,55
	35,2	36,22	36,06	84,31	15,69		
	36,57	37,68	37,56	89,19	10,81		
2,4	35,85	36,86	36,71	85,15	14,85	2,06	15,71
	18,43	19,44	19,27	83,17	16,83		
	36,22	37,32	37,15	84,55	15,45		
2,5	26,43	27,48	27,36	88,57	11,43	14,43	12,53
	17,75	18,84	18,67	84,40	15,60		
	18,7	19,74	19,63	89,42	10,58		
2,6	17,34	18,39	18,21	82,86	17,14	13,04	14,62
	15,91	17	16,84	85,32	14,68		
	16,83	17,91	17,78	87,96	12,04		
2,7	20,33	21,4	21,24	85,05	14,95	5,49	15,31
	28,98	30,09	29,9	82,88	17,12		
	16,15	17,16	17,02	86,14	13,86		
2,8	17,77	18,89	18,72	84,82	15,18	0,77	15,32
	36,63	37,63	37,47	84,00	16,00		
	15,82	16,97	16,8	85,22	14,78		
2,9	30,99	32	31,86	86,14	13,86	2,06	14,92
	16,96	17,96	17,81	85,00	15,00		
	27,16	28,23	28,06	84,11	15,89		
2,10	36,23	37,31	37,14	84,26	15,74	10,49	13,28
	20,98	22,05	21,93	88,79	11,21		
	35,95	36,96	36,83	87,13	12,87		
2,11	20,87	22,01	21,86	86,84	13,16	7,59	12,81
	35,2	36,23	36,08	85,44	14,56		
	19,82	20,94	20,82	89,29	10,71		

Anexo 4. Evaluación de actividad de agua

Muestra	Replica 1	Replica 2	Media	SD	SD %
2,1	0,635	0,629	0,632	0,00424	0,42%
2,2	0,610	0,615	0,613	0,00354	0,35%
2,3	0,619	0,618	0,619	0,00071	0,07%
2,4	0,625	0,621	0,623	0,00283	0,28%
2,5	0,606	0,613	0,610	0,00495	0,49%
2,6	0,603	0,605	0,604	0,00141	0,14%
2,7	0,601	0,614	0,608	0,00919	0,92%
2,8	0,601	0,608	0,605	0,00495	0,49%
2,9	0,601	0,605	0,603	0,00283	0,28%
2,10	0,607	0,611	0,609	0,00283	0,28%
2,11	0,608	0,606	0,607	0,00141	0,14%

Anexo 5. Prueba para determinar el color

Muestra	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Media	mmPfund	Categoria	SD
2,1	0,254	0,253	0,253	0,253	55,487	Ambar Claro	0,06%
2,2	0,244	0,247	0,246	0,246	52,636	Ambar Claro	0,15%
2,3	0,229	0,230	0,230	0,230	46,688	Ambar extra claro	0,06%
2,4	0,284	0,282	0,282	0,283	66,393	Ambar Claro	0,12%
2,5	0,234	0,234	0,234	0,234	48,299	Ambar extra claro	0,00%
2,6	0,238	0,239	0,239	0,239	50,034	Ambar extra claro	0,06%
2,7	0,240	0,240	0,239	0,240	50,406	Ambar Claro	0,06%
2,8	0,24	0,239	0,237	0,239	50,034	Ambar Claro	0,15%
2,9	0,227	0,227	0,227	0,227	45,696	Ambar extra claro	0,00%
2,10	0,228	0,227	0,227	0,227	45,820	Ambar extra claro	0,06%

Anexo 6. Contenido de cenizas

Muestra	Crisol vacio	Crisol + Muestra	Crisol +Muestra Mufla	%Ceniza	Media	SD
Unidad	g	g	g			
2,1	17,770	19,870	17,780	0,47619048	0,45924802	0,04664074
	17,760	20,220	17,770	0,40650407		
	16,820	18,840	16,830	0,4950495		
2,2	16,155	18,240	16,160	0,23980815	0,34984158	0,41592158
	17,540	19,820	17,540	0		
	16,430	18,900	16,450	0,8097166		
2,3	15,910	18,160	15,920	0,44444444	0,28255675	0,24556767
	19,330	21,810	19,340	0,40322581		
	18,980	21,100	18,980	0		
2,4	15,790	17,930	15,800	0,46728972	0,15576324	0,26978985
	19,680	21,750	19,680	0		
	19,610	21,760	19,610	0		
2,5	19,730	21,790	19,740	0,48543689	0,1618123	0,28026712
	35,850	37,850	35,850	0		
	38,440	40,570	38,440	0		
2,6	17,780	19,810	17,780	0	0,32224921	0,27932013
	16,370	18,490	16,380	0,47169811		
	17,740	19,760	17,750	0,4950495		
2,7	30,990	33,030	30,990	0	0,8154699	0,74369462
	18,420	20,440	18,440	0,99009901		
	18,680	20,740	18,710	1,45631068		
2,8	27,160	29,290	27,180	0,93896714	0,62330824	0,27367708
	36,210	38,420	36,220	0,45248869		
	35,190	37,280	35,200	0,4784689		
2,9	20,320	22,410	20,330	0,4784689	0,47033217	0,00889868
	32,030	34,200	32,040	0,46082949		
	20,400	22,520	20,410	0,47169811		
2,10	16,440	18,500	16,450	0,48543689	0,64734162	0,27214489
	17,020	19,100	17,040	0,96153846		
	26,430	28,450	26,440	0,4950495		

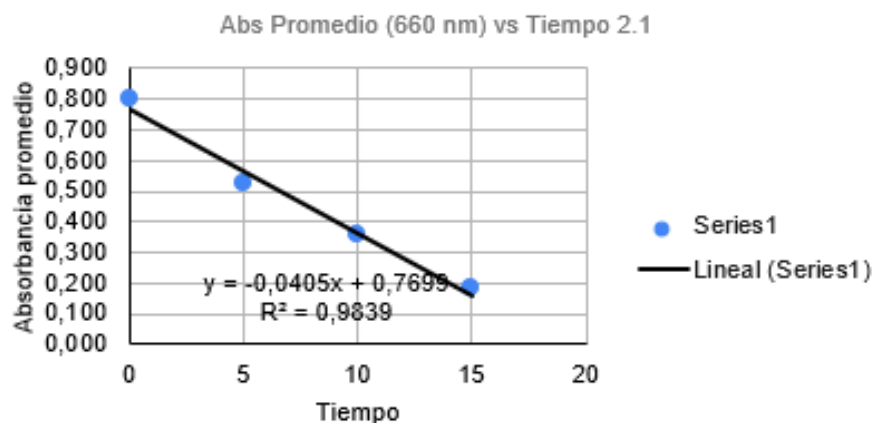
Anexo 7. Determinación de pH

Muestra	Gramos miel	Gramos miel + agua	PH Inicial
2,1	1,3299	10,8816	5,21
2,2	1,3321	10,9794	5,15
2,3	1,3315	10,9573	4,64
2,4	1,3311	11,0012	6,18
2,5	1,3298	11,2032	6,64
2,6	1,3283	11,2706	5,08
2,7	1,3301	10,9594	4,41
2,8	1,3332	11,2509	5,41
2,9	1,33	11,0452	5,78
2,10	1,3367	10,899	5,7
2,11	1,328	10,9972	5,6

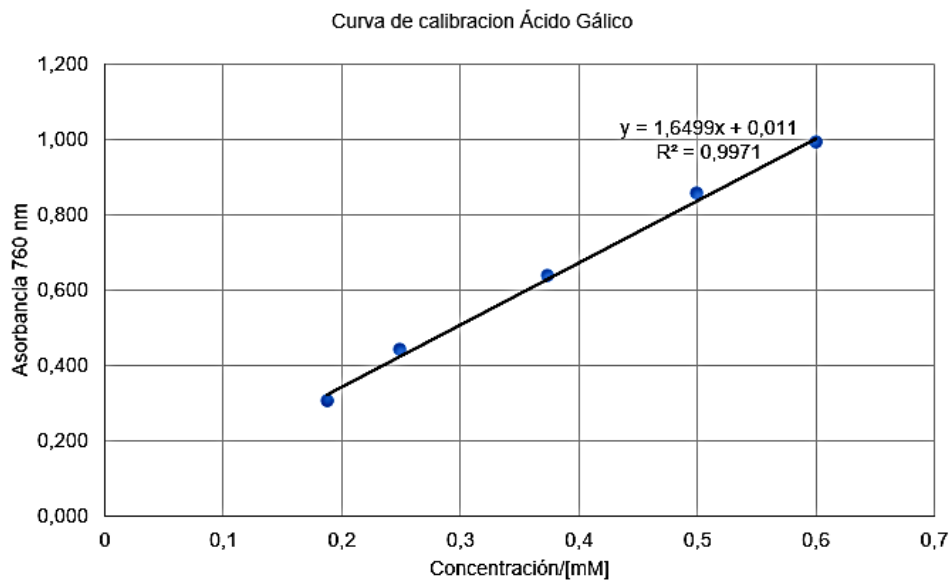
Anexo 8. Índice de diastasa

Muestra	Abs	Abs	Abs	Tiempo	Media	Cálculo	ID
2,1	0,803	0,812	0,79	0	0,802	13,2098765	22,7102804
	0,526	0,53	0,515	5	0,524		
	0,353	0,363	0,353	10	0,356		
	0,173	0,188	0,184	15	0,182		

Anexo 9. Absorbancia Promedio

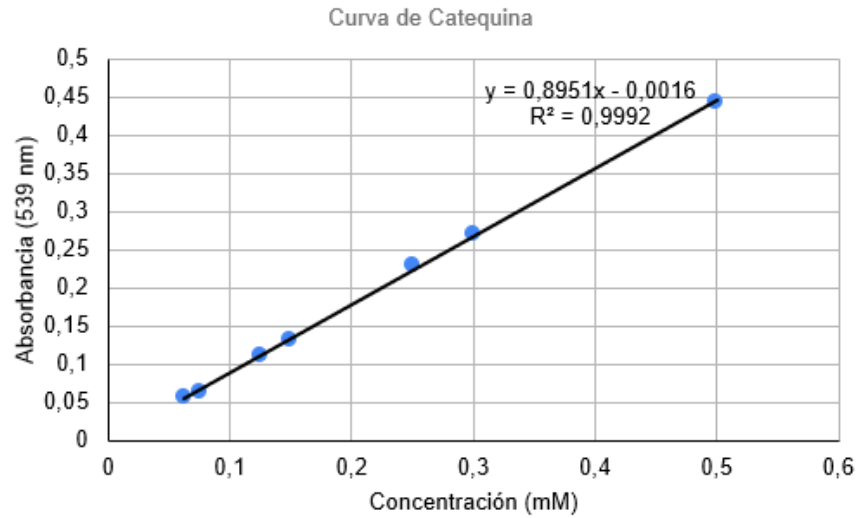


Anexo 10. Contenido de fenoles



Muestra	Abs	Abs	Abs	Media	SD	Resultado
2,1	0,484	0,519	0,441	0,481	0,810	0,285
2,2	0,508	0,517	0,48	0,502	0,849	0,297
2,3	0,475	0,42	0,434	0,443	0,929	0,262
2,4	0,554	0,595	0,566	0,572	0,914	0,340
2,5	0,583	0,527	0,548	0,553	0,974	0,328
2,6	0,37	0,589	0,27	0,410	1,103	0,242
2,7	0,544	0,582	0,526	0,551	1,075	0,327
2,8	0,665	0,621	0,628	0,638	1,081	0,380
2,9	0,556	0,546	0,524	0,542	1,179	0,322
2,10	0,716	0,505	0,744	0,655	0,730	0,390
2,11	0,553	0,571	0,554	0,559	0,775	0,332

Anexo 11. Contenido de flavonoides

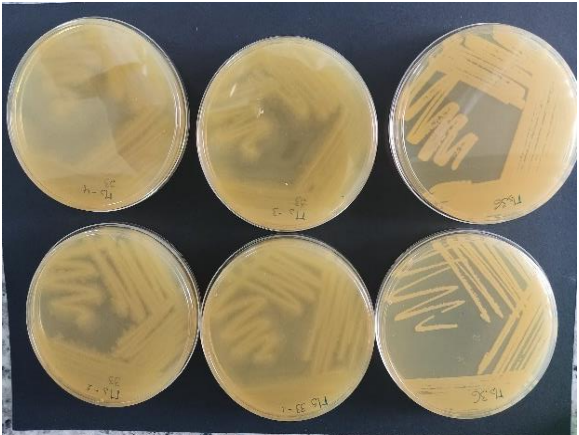
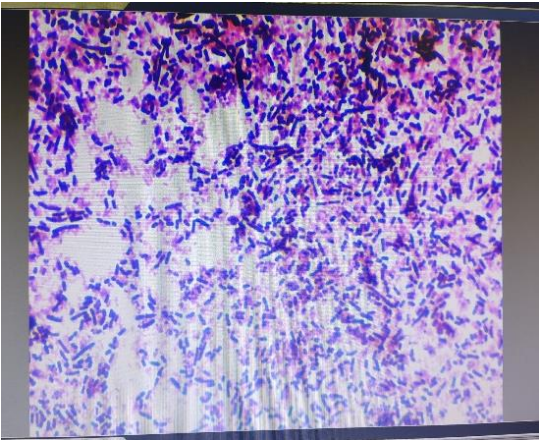


Muestra	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Media	SD	Resultado
2,1	0,094	0,104	0,102	0,100	0,00529	27,73
2,2	0,095	0,108	0,08	0,094	0,01401	25,68
2,3	0,085	0,077	0,079	0,080	0,00416	20,63
2,4	0,096	0,113	0,100	0,103	0,00889	28,81
2,5	0,068	0,075	0,09	0,078	0,01124	19,66
2,6	0,072	0,074	0,079	0,075	0,00361	18,70
2,7	0,066	0,072	0,071	0,070	0,00321	16,77
2,8	0,075	0,069	0,093	0,079	0,01249	20,14
2,9	0,083	0,069	0,076	0,076	0,00700	19,06
2,10	0,061	0,067	0,071	0,066	0,00503	15,57
2,11	0,068	0,088	0,061	0,072	0,01401	17,74

Anexo 12. Imágenes Tratamientos Miel de eucalipto



Anexo 13. *Mammalicoccus sciuri*



Anexo 14. Pruebas estadísticas para determinar UFC

Rangos				
	VAR00001	N	Rango promedio	Suma de rangos
VAR00003	Miel	15	9,10	136,50
	Solucioín azucarada	15	21,90	328,50
	Total	30		

Estadísticos de prueba^a

VAR00003	
U de Mann-Whitney	16,500
W de Wilcoxon	136,500
Z	-3,985
Sig. asintótica(bilateral)	,000
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,000 ^b

a. Variable de agrupación: VAR00001

b. No corregido para empates.

Anexo 15. Escala de sensibilidad para halos de inhibición

Escala de sensibilidad	
Sensibilidad	mm
1- Nula	< 8
2-Sensible	8-14
3-Muy sensible	14 - 20
4- Sumamente sensible	> 20

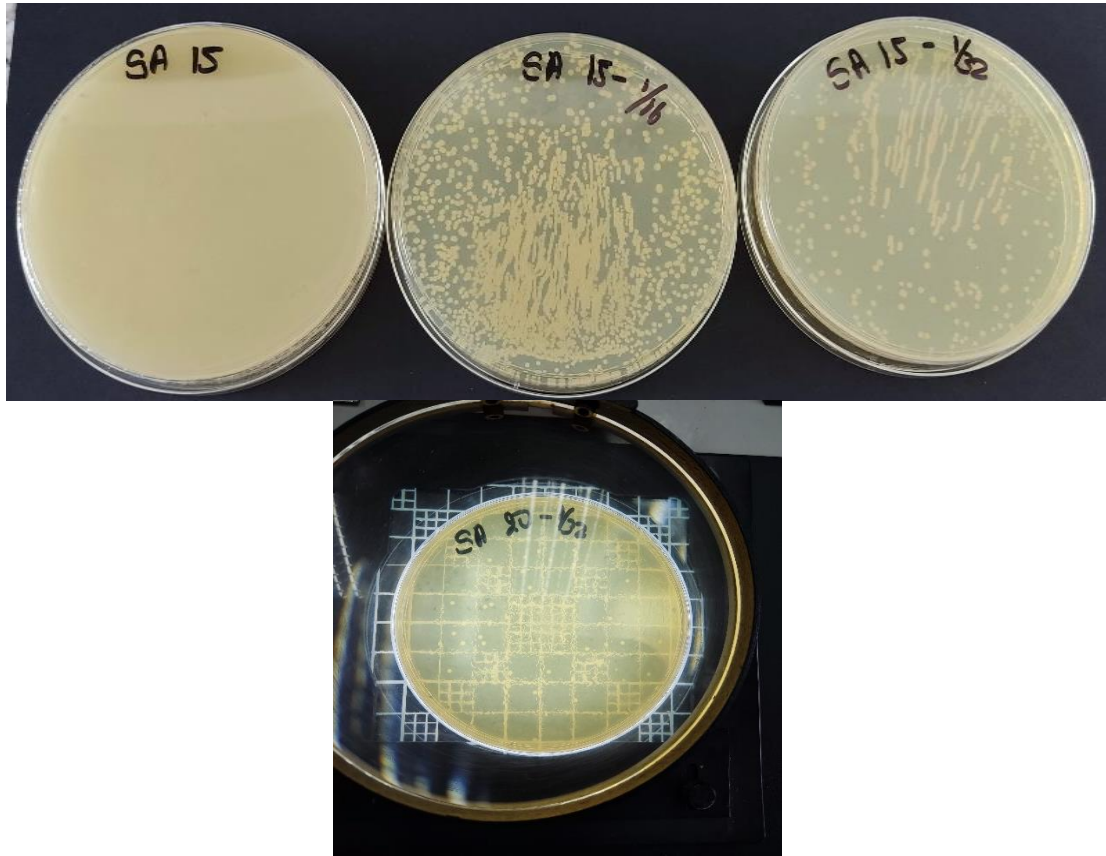
Anexo 16. Medidas de halos de inhibición usando miel de eucalipto como antimicrobiano.

Dilución	MIEL EUCALIPTO		
25%	24 mm	23 mm	25 mm
20%	20 mm	19 mm	22 mm
15%	18 mm	16 mm	20 mm
10%	13 mm	12 mm	14 mm
5%	-	-	-
Agua Estéril	-	-	-

Anexo 17. Medidas de halos de inhibición utilizando solución azucarada como antimicrobiano.

Dilución	SOLUCIÓN AZUCARADA		
25%	18 mm	22 mm	20 mm
20%	14 mm	16 mm	16 mm
15%	12 mm	14 mm	12 mm
10%	-	-	-
5%	-	-	-
Agua Estéril	-	-	-

Anexo 18. Conteo de unidades formadoras de colonia



Anexo 19. Estadística para inhibición bacteriana

Rangos

	VAR00001	N	Rango promedio
VAR00003	1,00	3	2,00
	2,00	3	5,00
	3,00	3	9,50
	4,00	3	11,00
	5,00	3	12,50
	Total	15	

Estadísticos de prueba^{a,b}

VAR00003	
H de Kruskal-Wallis	12,526
gl	4
Sig. asintótica	,014

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: VAR00001

Anexo 20. Medidas de absorbancia en pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano utilizando miel de eucalipto

Dilución	MIEL DE EUCALIPTO		
25%	0,184	0,181	0,182
20%	0,192	0,19	0,179
15%	0,202	0,236	0,284
10%	0,437	0,438	0,451
5%	0,523	0,538	0,578
Control Positivo	0,863	0,846	0,907
Control Negativo	0,159	0,164	0,117

Anexo 21. Medidas de absorbancia en pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano utilizando solución azucarada

Dilución	SOLUCIÓN AZUCARADA		
25%	0,206	0,199	0,188
20%	0,280	0,340	0,260
15%	0,465	0,467	0,384
10%	0,551	0,462	0,533
5%	0,654	0,693	0,646
Control Positivo	0,881	0,852	0,873
Control Negativo	-	-	-

Anexo 22. Pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano



Anexo 23. Actividades realizadas bajo la supervisión de la Tutora de tesis

