



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN SUPERIOR TECNOLÓGICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



**EFFECTO DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA MIEL DE *Melipona  
beecheii* EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE VIRULENCIA DE  
*E. coli* O157:H7**

TESIS PROFESIONAL

PARA OPTAR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

**LUIS FELIPE POOL YAM**

DIRECTORA DE TESIS:

**DRA. ELIZABETH DE LA LUZ ORTIZ VÁZQUEZ**

CO-ASESOR:

**M.C. JESÚS MANUEL RAMÓN SIERRA**

19 de junio de 2017

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO



DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.  
No. DE OFICIO: X-159/2017

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Mérida, Yucatán a 25 de mayo de 2017

**C. LUIS FELIPE POOL YAM**  
Pasante de la Maestría en Ciencias de los  
Alimentos y Biotecnología  
Presente

De acuerdo al fallo emitido por su asesora la **Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez**, su coasesor el M. en C. Jesús Manuel Ramón Sierra y la comisión revisora integrada por el Dr. Denis Israel Magaña Ortiz y el Dr. Jesús Alejandro Yam Puc, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

**"Efecto de los Compuestos Bioactivos de la miel de *Melipona beecheii* en la Expresión de los genes de virulencia de *E. coli* 0157:H7"**

ATENTAMENTE  
IN HOC SIGNO VINCES

**DR. DANIEL ARCÁNGEL LÓPEZ SAURI**  
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Archivo  
DAIS/fja.



S.E.P.  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE MERIDA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACION



SEP Instituto Tecnológico de Mérida, Km.5 Carnatera Mérida-Progreso A.P.911  
C.P.97118 Mérida Yucatán, México. Tels. 964-80-00, Ext. 10001, 10401  
10601, 10201 e-mail:am@itmerida.mx <http://www.itmerida.mx>



## **DEDICATORIAS**

### **A Dios:**

*Por haberme concedido salud y sabiduría para poder concluir este logro en mi vida como profesionalista, por guiarme en el camino correcto de la vida y en esta etapa de la maestría y brindarme cada día tu infinito amor.*

### **A Mis Padres María Eugenia Yam Cruz y Juan Bautista Pool Puch**

*Por apoyarme en todas mis decisiones, por brindarme su amor incondicional, cariño, comprensión. Por todo el apoyo que un padre y madre puede brindarle a un hijo, por enseñarme los principios para seguir adelante y ser una mejor persona.*

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A la Dra. Elizabeth De La Luz Ortiz Vásquez:**

*Por haberme permitido ser parte de su equipo de laboratorio, por brindarme su apoyo en los congresos donde tuve la oportunidad de asistir; por brindarme enseñanzas a través de sus conocimientos, por su confianza, tiempo y comprensión en el transcurso de mi estancia en la maestría, por ser mi maestra y directora de tesis.*

### **Al M.C Jesús Manuel Ramón Sierra:**

*Por brindarme su apoyo en la guía como alumno de maestría; por su tiempo, dedicación, confianza, comprensión y sobre todo por ser mí co-asesor de tesis, mi maestro y un gran amigo.*

### **Al Dr. Denis Magaña:**

*Por haberme compartido sus conocimientos, consejos y tiempo, para mejorar y enriquecer éste trabajo de tesis profesional.*

### **Al Dr. Alejandro Yam:**

*Por ser mi revisor de tesis y por brindarme su amistad y confianza.*

### **A mis amigos y compañeros de laboratorio:**

*Nidia Ester, Carlos Rubiel, Ezequiel, Gabriel, Roberto, Keith, Gilberto, Mónica y Janeth, por brindarme su amistad y por hacer más a gusto nuestra estancia en el laboratorio.*

## Resumen

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) representan un grave problema a nivel mundial, siendo una de las principales causas de padecimientos en los últimos años. Entre las cepas patógenas con mayor incidencia, especialmente en infantes se encuentra *E. coli* O157: H7, la cual es el principal serotipo asociado con brotes de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. La problemática que ocasiona *E. coli* O157:H7 se relaciona con los diferentes mecanismos de patogenicidad. Otra problemática es que los tratamientos actuales resultan ser poco eficientes contra este patógeno, por lo que la búsqueda de nuevos compuestos capaces de combatir a este patógeno se ha convertido en una necesidad urgente. Estudios recientes, han demostrado que la miel de *Melipona beecheii* tiene diferentes propiedades terapéuticas entre las que se encuentra la capacidad de inhibir diferentes patógenos como *E. coli*. Por lo que el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de los compuestos bioactivos de *Melipona beecheii* sobre los mecanismos de virulencia de *E. coli* O157: H7. Se determinó la capacidad antimicrobiana y concentración mínima inhibitoria del extracto proteico, fenólico y de la miel de melipona contra *E. coli* ATCC 25922 y O157:H7, por el método de difusión en disco y micro diluciones respectivamente. Se determinó el efecto del extracto proteico, fenólico y la miel sobre la actividad hemolítica de *E.coli* O157:H7 y sobre los niveles de expresión de los genes de virulencia *Stx1A*, *EAE*, *Hlye*. El extracto proteico, fenólico y la miel de melipona, mostraron inhibir el crecimiento de *E. coli* 25922 y O157:H7, también se determinó que ambos extractos y la miel poseen un efecto bactericida contra este patógeno. La miel y ambos extractos mostraron disminuir de manera significativa la actividad hemolítica de la O157:H7, además la miel y sus compuestos mostraron proteger los glóbulos rojos de la hemolisina producida por el patógeno. La miel de melipona pudo reducir los niveles de expresión de los genes de virulencia *Stx1A*, *EAE*. La miel de Melipona y sus compuestos proteicos y fenólico son excelentes candidatos para usarse como tratamiento alternativo contra *E. coli* O157:H7, inhibiendo el crecimiento de esta cepa, además de interferir con los mecanismos de patogenicidad de esta cepa a diferentes niveles.

## Abstract

Foodborne illnesses represent a global problem; it is one of the main causes of diseases in recent years. Among the strains with the highest incidence, especially in infants, is *E. coli* O157: H7, being also the main serotype associated with outbreaks of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. The problem caused by *E. coli* O157:H7 is related to the different mechanisms of pathogenicity. Another problem is that current treatments are not very efficient against this pathogen, so the search for new compounds capable of combating this pathogen has become an urgent need. Recent studies have shown that *Melipona beecheii* honey has different therapeutic properties, among which, is the capacity to inhibit different pathogens such as *E. coli*. Therefore, the present work aims to evaluate the effect of *Melipona beecheii* honey bioactive compounds on *E. coli* O157: H7 virulence mechanisms. The antimicrobial capacity and minimum inhibitory concentration of the protein, phenolic extract and melipone honey against *E. coli* ATCC 25922 and O157: H7 were determined by disk diffusion and micro dilutions methods respectively. The effect of protein, phenolic extract and honey on the *E. coli* O157:H7 hemolytic activity and the expression levels of the virulence genes *Stx1A*, *EAE*, *Hlye* were determined. Protein, phenolic extract and melipone honey inhibited the growth of both *E. coli* 25922 and O157:H7, it was also determined that both extracts and honey have bactericidal effects against these pathogens. This honey and both extracts caused a significant decrease in the hemolytic activity of *E. coli* O157:H7, and honey and its compounds sheltered the red blood cells from the hemolysin of the pathogen. Melipone honey reduced levels of expression of virulence genes *Stx1A*, *EAE*. Melipone honey, protein and phenolic extract are excellent candidates to use as an alternative treatment against *E. coli* O157:H7, inhibiting the growth of this strain, in addition to interfering with the pathogenicity mechanisms of this pathogen at different levels.

# Contenido

Capítulo 1 Introducción.....	1
Capítulo 2 Antecedentes .....	3
2.1 Enfermedades Transmitidas por Alimentos.....	3
2.2 Serotipado .....	5
2.3 Grupos patógenos de <i>E. coli</i> .....	7
2.4 Factores de virulencia de <i>E. coli</i> O157:H7.....	9
2.4.1 Toxinas Shiga.....	10
2.4.2 Adherencia: formación de la lesión de A/E .....	13
2.4.3 Plásmido pO157 .....	15
2.4.4 LPS y cápsula.....	16
2.5 <i>E. coli</i> O157:H7.....	16
2.6 México y países en desarrollo .....	18
2.7 Resistencia de <i>Escherichia coli</i> a los antibióticos.....	19
2.8 Tratamiento contra <i>E. coli</i> Enterohemorrágica.....	20
2.9 Miel de <i>Melipona beecheii</i> .....	22
2.9.1 Actividad antimicrobiana de la miel.....	23
Capítulo 3 Justificación .....	26
Capítulo 4. Objetivos .....	27
4.1 Objetivo general.....	27
4.2 Objetivos específicos.....	27
Capítulo 5 Hipótesis .....	27
Capítulo 6 Materiales y Métodos .....	28
6.1 Materia prima y microorganismo empleados.....	28
6.2 Determinación de la actividad antibacteriana de la miel de <i>Melipona beecheii</i> por el método de difusión en disco.....	28
6.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de la Miel de <i>Melipona beecheii</i> por el método de micro dilución. ....	29
6.4 Extracción de los compuestos fenólicos de la miel de <i>Melipona beecheii</i> .....	30
6.5 Determinación del contenido fenólico del extracto fenólico de la miel de <i>Melipona beecheii</i> .....	31
6.6 Extracción de los compuestos proteicos de la miel de <i>Melipona beecheii</i> .....	31
6.7 Determinación de la concentración Proteica en la miel de <i>Melipona beecheii</i> .....	32

6.8 Determinación del perfil proteico y peso molecular mediante un sistema SDS-PAGE. ....	32
6.9 Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos fenólicos y proteicos de la miel de <i>Melipona beecheii</i> mediante difusión en disco. ....	33
6.10 Determinación de Concentración mínima inhibitoria de los extractos fenólicos y proteicos de la miel de Melipona. ....	33
6.11 Cinética de letalidad de <i>E.coli</i> O157:H7 en presencia de la miel de <i>Melipona beecheii</i> y de sus extractos proteico y fenólico. ....	34
6.12 Evaluación de la actividad hemolítica en presencia de la miel de <i>Melipona beecheii</i> y los extractos proteicos y fenólicos. ....	34
6.13 Visualización por microscopia electrónica de barrido ....	35
6.14 Diseño de primers. ....	36
6.15 Extracción del ADN genómico de <i>E. coli</i> O157:H7. ....	37
6.16 Detección de presencia de los genes Housekeeping y de Virulencia de <i>E.coli</i> O157:H7. ....	38
6.17 Extracción de ARN bacteriano para la detección de la expresión de los genes de virulencia y housekeeping ....	39
6.18 Síntesis de la primera cadena de ADN (cDNA) para la detección de la expresión de los genes de virulencia y housekeeping. ....	40
6.19 Extracción de ARN para la evaluación de los niveles de expresión de los genes de virulencia de <i>E. coli</i> O157:H7. ....	41
6.20 Niveles de transcripción de los genes de virulencia de <i>E. coli</i> O157:H7 por qRT-PCR. ....	42
Capítulo 7 Resultados y discusión. ....	43
7.1 Cuantificación de los extractos de la miel de <i>Melipona beecheii</i> . ....	43
7.2 Determinación del perfil proteico de la miel de <i>Melipona beecheii</i> . ....	46
7.3 Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco. ....	47
7.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la miel de <i>Melipona beecheii</i> y de los extractos proteicos y fenólicos contra <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>E. coli</i> ATCC 25922. ....	51
7.5 Evaluación de la actividad hemolítica de <i>E. coli</i> O157:H7 en presencia de la miel, extracto proteico y fenólico. ....	54
7.6 Visualización de las hemolisis por SEM. ....	57
7.7. Curvas de letalidad de <i>E. coli</i> O157:H7 en presencia de la miel y de los extractos proteicos y fenólicos. ....	60

<b>7.8 Validación de los genes housekeeping y de virulencia de <i>E. coli</i> O157:H7 a partir de DNA.</b>	<b>66</b>
<b>7.9 Extracción de ARN de <i>E. coli</i> O157:H7 y validación de la expresión de los genes housekeeping y de virulencia de <i>E. coli</i> O157:H7 a partir de cDNA.</b>	<b>68</b>
<b>7.10 Extracción y cuantificación de ARN de <i>E. coli</i> O157:H7 crecido en concentración subletal de miel y EP.</b>	<b>72</b>
<b>7.11 Amplificaciones de los genes housekeeping y virulencia de <i>E. coli</i> O157:H7 por qRT-PCR y el Análisis de las curvas de melting.</b>	<b>74</b>
<b>7.12 Evaluación de los niveles de expresión relativa de los genes de virulencia de <i>E. coli</i> O157:H7.</b>	<b>78</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>82</b>
<b>Anexos</b>	<b>83</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>92</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 2.1</b> Principales antígenos de superficie (O, K, H y F) en <i>E. coli</i> (Blanco et al., 2002) ..6	6
<b>Figura 2. 2</b> Hidrólisis por furina de la parte A de las toxinas Shiga. La furina hidroliza la cadena polipeptídica en la secuencia RXXR que se localiza entre ambos fragmentos que permanecen unidos por un enlace disulfuro (Garred et al., 1995).....11	11
<b>Figura 2. 3</b> Estructura primaria de las cadenas catalíticas (A) de las toxinas Shiga de <i>S. dysenteriae</i> (Stx), <i>E. coli</i> (Stx1 y Stx2) y ricina. Las secuencias de aminoácidos han sido deducidas de la secuencia nucleotídica de los genes. Los asteriscos indican la posición de aminoácidos idénticos (Fraser et al., 2004). .....12	12
<b>Figura2. 4</b> Estructura primaria de las cadenas B de las toxinas Shiga de <i>S. dysenteriae</i> (Stx) y de <i>E. coli</i> (Stx1 y Stx2). Las secuencias de aminoácidos han sido deducidas de la secuencia nucleotídica de los genes. Los asteriscos indican la posición de aminoácidos idénticos (Fraser et al., 2004). .....13	13
<b>Figura 2. 5</b> Esquema de 4 pasos planteado por Clarke <i>et al.</i> , 2003. ....15	15
<b>Figura 7. 1</b> Perfil proteico de miel de <i>Melipona beecheii</i> en un gel desnaturizante al 12% de poliacrilamida. ....46	46
<b>Figura 7. 2</b> Actividad antimicrobiana contra <i>E. coli</i> ATCC 25922. A (ampicilina 30 µg) C (control negativo). ....49	49
<b>Figura 7. 3</b> Actividad antimicrobiana contra <i>E. coli</i> O157:H7. A (ampicilina) C (control negativo). ....50	50
<b>Figura 7. 4</b> Concentraciones mínimas inhibitorias de la miel, extracto proteico y fenólico para la <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>E. coli</i> ATCC 25922.....52	52
<b>Figura 7. 5</b> Actividad hemolítica de <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>E. coli</i> ATCC 25922 en presencia de miel de <i>Melipona beecheii</i> . ....54	54
<b>Figura 7. 6</b> Actividad hemolítica de <i>E. coli</i> O157:H7 en presencia del extracto proteico de miel de <i>Melipona beecheii</i> . ....55	55
<b>Figura 7. 7</b> Actividad hemolítica de <i>E. coli</i> O157:H7 en presencia del extracto fenólico de miel de <i>Melipona beecheii</i> . ....57	57
<b>Figura 7. 8</b> Actividad hemolítica de <i>E. coli</i> O157:H7 visualizados por SEM. <b>A)</b> Hemólisis O157:H7, <b>B)</b> Tratamiento con miel, <b>C)</b> Tratamiento con el extracto proteico y <b>D)</b> Tratamiento con el extracto fenólico. ....58	58

<b>Figura 7. 9 A)</b> Cinéticas de letalidad de <i>E. coli</i> O157:H7 expuesto con 1x y 2x CMI del extracto proteico de la miel de <i>Melipona beecheii</i> (E.P), 1x y 2x CMI de ampicilina (Amp). <b>B)</b> Cinéticas de muerte de <i>E. coli</i> O157:H7 a partir las células viables (UFC/mL) después de estar expuestas al E.P y Amp. ....	62
<b>Figura 7. 10 A)</b> Cinéticas de letalidad de <i>E. coli</i> O157:H7 expuesto con 1x y 2x CMI del extracto fenólico de la miel de <i>Melipona beecheii</i> (E.F). <b>B)</b> Cinéticas de muerte de <i>E. coli</i> O157:H7 a partir de las células viables (UFC/mL) después de estar expuesta con E.F y Amp. ....	64
<b>Figura 7. 11 A)</b> Cinéticas de letalidad <i>E.coli</i> O157:H7 medido por densidad óptica expuesto con 1x y 2x CMI de miel de <i>Melipona beecheii</i> . <b>B)</b> Cinéticas de muerte de <i>E.coli</i> O157:H7 medidas por las células viables (UFC/mL) después de estar expuesta con 1x y 2x CMI de miel de <i>Melipona beecheii</i> .....	65
<b>Figura 7. 12</b> Visualización del ADN bacteriano de <i>E.coli</i> O157:H7 por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.....	66
<b>Figura 7. 13</b> Validación de la presencia de los genes housekeeping de <i>E. coli</i> O157:H7 por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. ....	67
<b>Figura 7. 14</b> Validación de la presencia de los genes de virulencia de <i>E. coli</i> O157:H7 por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. ....	68
<b>Figura 7. 15</b> Visualización de los dos fragmentos de ARN de <i>E. coli</i> O157:H7 crecido en los medios B+G y B+S por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% .....	69
<b>Figura 7. 16</b> Detección de la expresión de gen los genes de virulencia de <i>E. coli</i> O157:H7 a partir de ADNc crecido en medio de Brucella suplementado con 0.1% de glóbulos rojos (B+G) y 10% de suero feral bovino (B+S) por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. ....	70
<b>Figura 7. 17</b> Detección de la expresión de los genes housekeeping de <i>E. coli</i> O157:H7 a partir de ADNc crecido en medio B+S. ....	71
<b>Figura 7. 18</b> Visualización de los fragmentos de ARN de <i>E. coli</i> O157H7 crecido en concentraciones sub-letales de miel y E.P. por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. ....	72
<b>Figura 7. 19</b> Figura Amplificación de los genes ECid, ECpgi, EAE, Stx1A y HlyE por RT-PCR. <b>A)</b> En presencia de 6/8x CMI de miel. <b>B)</b> En presencia de 6/8x CMI del E.P.....	75
<b>Figura 7. 20</b> Curvas de melting.de los genes EAE, Stx1A, HlyE, ECpgi y ECid. <b>A)</b> con/sin tratamiento 6/7x CMI miel de <i>Melipona beecheii</i> . <b>B)</b> Con/sin tratamiento 6/7x CMI extracto proteico de la miel de <i>Melipona beecheii</i> .....	77

**Figura 7. 21** Visualización del gen HlyE por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Carril1- los oligos *Forward* y *Reverse*, Carril 2- Oligo *Forward*.....77

**Figura 7. 22** Niveles de expresión relativa de los genes de virulencia *stx1a* y *eae* con tratamiento de miel de *Melipona beecheii*. **A)** Normalizado la expresión con el gen housekeeping ECid. **B)** Normalizado la expresión con el gen housekeeping ECpgi. ....78

**Figura 7. 23** Niveles de expresión relativa de los genes de virulencia *Stx1A* y *EAE* con tratamiento del E.P. **A)** Normalizado la expresión con el gen housekeeping ECid. **B)** Normalizado la expresión con el gen housekeeping ECpgi. ....79

## Índice de Tablas

**Tabla 2. 1** Concentración mínima inhibitoria de diferentes tipos de miel contra los microorganismos de importancia media. ....24

**Tabla 2. 2** Actividad antimicrobiana de miel de abeja sin aguijón contra *E.coli*. ....25

**Tabla 6. 1** Genes housekeeping y de virulencia de *E. coli* O157:H7.....36

**Tabla 6. 2** Gradiente de temperaturas para PCR.....39

**Tabla 7. 1** Cuantificación de los extractos fenólicos de la miel de *Melipona beecheii*.....44

**Tabla 7. 2** Concentración de compuestos fenólicos totales en miel de distintos orígenes.....45

**Tabla 7. 3** Cuantificación de ARN de *E. coli* O157 con/sin tratamiento de miel y Extracto proteico (E.P).....73

## Capítulo 1 Introducción.

A través de los alimentos se pueden transmitir múltiples enfermedades. En la mayoría de los países estas dolencias constituyen uno de los mayores problemas de salud pública. Los alimentos pueden transmitir enfermedades debido a contaminaciones físicas, químicas o biológicas. Siendo la contaminación biológica la segunda causa de muerte de niños a nivel mundial y de esta manera constituyendo un problema de salud pública creciente en todo el mundo. Este problema se debe a la ingestión de alimentos contaminados por microorganismos patógenos para el hombre. La manifestación clínica más común de una enfermedad transmitida por los alimentos consiste en la aparición de síntomas gastrointestinales, pero estas enfermedades también pueden dar lugar a síntomas neurológicos, ginecológicos, inmunológicos y de otro tipo. Las enfermedades gastrointestinales son causadas por diversos patógenos como *Salmonella*, *norovirus*, *Campylobacter*, *Toxoplasma*, *Listeria*, *Clostridium perfringens* y *E. coli*. Esta última, es una de las bacterias más frecuentemente asociada a los cuadros clínicos de estas enfermedades gastrointestinales. Esta bacteria es una de las especies nativas en la flora del intestino del humano, coexistiendo con hombre de manera inocua. No obstante existen diferentes serotipos de esta cepa, las cuales pueden causar daños drásticos al hospedero e incluso la muerte, este tipo de bacterias pueden clasificarse en base a sus factores de virulencia, siendo la más importante la O157:H7 productora de toxinas Shiga (Stx), que presenta una alta incidencia de infecciones y siendo el principal serotipo asociado a brotes de colitis hemorrágicas considerándose el principal agente causal del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Aún cuando existen diferentes tratamientos con diversos antibióticos de nueva generación, en los últimos años, se ha observado un aumento en la resistencia a estos fármacos, otro problema que enfrentan los fármacos, es que los mecanismo de acción de estos compuestos son sobre la pared celular bacteriana, es decir que aún cuando los antibióticos logren lisar a la bacteria, las toxinas producidos por estos patógenos continúa afectando al huésped llevándolo a su muerte, por lo que la búsqueda de

nuevos agentes que posean más de un mecanismo de acción se convierte en una necesidad.

Una alternativa al empleo de antibióticos y sus derivados son los compuestos o sustancias naturales que contengan más de un compuesto activo para el tratamiento contra estos patógenos. Una sustancia de origen natural para combatir las infecciones bacterianas es la miel de Melipona cuyo uso como fuente de alimento y agente médico está documentado desde la civilización maya. Actualmente se ha documentado que la miel de *Melipona beecheii* posee actividad antimicrobiana contra diversos patógenos incluyendo *E. coli*. Por lo que en este trabajo se evaluó la capacidad antimicrobiana de la miel de Melipona contra *E. coli* O157:H7 así como los niveles de expresión de los genes virulencia en presencia del extracto proteico y fenólico obtenidos a partir de la miel de *Melipona beecheii*.

## Capítulo 2 Antecedentes

### 2.1 Enfermedades Transmitidas por Alimentos

Las Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son ocasionadas por consumir agua o alimentos contaminados con concentraciones altas de microorganismos patógenos o de productos de su metabolismo que sean tóxicos para el ser humano (OMS). Diferentes agentes patógenos pueden estar presentes en los alimentos debido a las malas prácticas higiénicas que se aplican durante la obtención, transporte, almacenamiento y comercialización de los alimentos. Se han descrito más de 250 enfermedades diferentes transmitidas por los alimentos contaminados (González-Flores, 2005) y estas enfermedades constituyen en el ámbito mundial, uno de los problemas sanitarios más comunes y de mayor impacto sobre la salud de las personas, afectando principalmente a la población de bajos recursos, niños, mujeres embarazadas y ancianos (FDA, 2013). El Consejo para la Información sobre Seguridad de Alimentos y Nutrición (CISAN) en el 2011 indicó que el 90 % de todas estas enfermedades son causados por los patógenos como: *Salmonella*, *norovirus*, *Campylobacter*, *Toxoplasma*, *E. coli*, *Listeria* y *Clostridium perfringens*.

Las enfermedades transmitidas por alimentos se han ido expandiendo poco a poco por los países del mundo, tanto desarrollados como en vías de desarrollo. Éstos, sin respetar fronteras, han causado cuantiosas pérdidas de vidas humanas, como grandes pérdidas económicas (Díaz, 2003; González-Flores, 2005). El centro para el Control y Prevención de las Enfermedades (CDC) estima que cada año 76 millones de personas se enferman, más de 300,000 son hospitalizados y 5,000 americanos mueren como resultado de enfermedades alimentarias (González-Núñez, 2011). La OMS estima que cada año 2000 de personas se enferman en todo el mundo por las ETA.

Entre las enfermedades transmitidas por alimentos contaminados, la diarrea aguda es la enfermedad más común. La diarrea aguda es una enfermedad intestinal

generalmente infecciosa y auto limitada, se caracteriza por presentar evacuaciones líquidas o de consistencia disminuida, en número mayor a tres en 24 horas y con evolución menor de dos semanas. La enfermedad diarreica es uno de los problemas de salud pública de mayor importancia en el mundo de acuerdo con estudios efectuados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el fondo de las naciones unidas para la infancia (UNICEF).

La bacteria que está más frecuente asociada con los cuadros clínicos de diarrea aguda es *E. coli*, la cual pertenece a la familia Enterobacteriaceae, (FDA, 2014). *E. coli* es responsable de aproximadamente 630 millones de casos de diarrea en el mundo y entre 5 a 6 millones de muertes al año, afectando principalmente a la población infantil de países en desarrollo, constituyendo la segunda causa global de mortalidad infantil de países en desarrollo (Blanco *et al.*, 2002).

En América Latina las ETA representan alrededor del 70% de los casos de diarrea aguda, según estimaciones de la OMS. De igual manera se ha estimado que en Asia, África y Latinoamérica, en razón a los factores socioeconómicos y nutricionales, la probabilidad de que un niño muera por ésta enfermedad antes de los 7 años puede llegar al 50% de los casos. En los países desarrollados la mortalidad es mucho menor, pero todavía significativa (Máttar *et al.*, 2001; Eguiarte *et al.*, 2005).

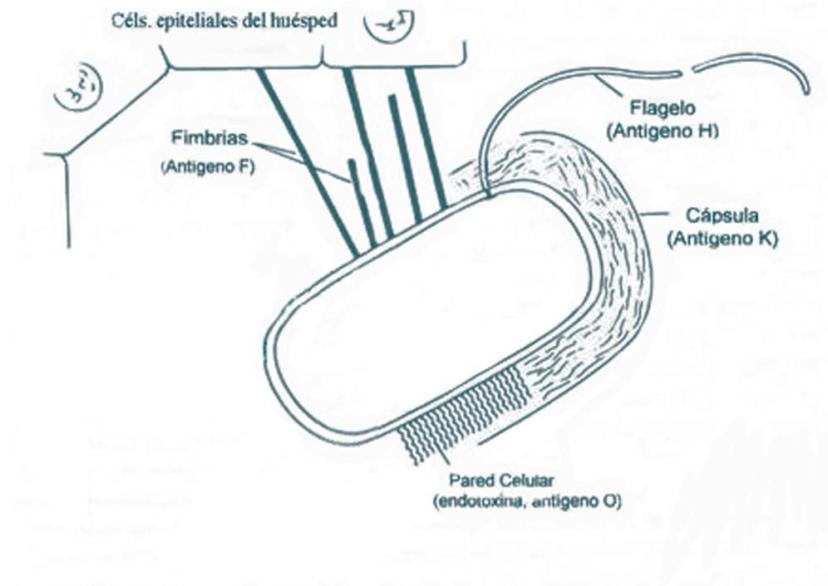
En México, la mayoría de los cuadros diarreicos son de naturaleza infecciosa, (Vásquez-Arroyo y Cabral-Martell, 2001). En el año 2000 el índice de casos de diarrea aguda fue de 7,004 por cada 100,000 habitantes, en el 2010 se reportan 5,264 casos por cada 100,000 habitantes (Ferreira-Guerrero *et al.*, 2013).

Debido a que *E. coli* es la causante de la diarrea se han agrupado en diferentes grupos de patógenos, para determinar a qué grupo patógeno pertenecen, se ha usado el serotipado, el cual es un sistema frecuentemente usado para la clasificación intraespecífica de *E. coli* debido a que las cepas patógenas suelen presentar características fenotípicas diferentes a las que muestra la cepa de este tipo de especie (Otero-Álvarez, 2014).

## 2.2 Serotipado

Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen en 1944 Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación:

- El antígeno somático (O) o de pared celular es un polisacárido termoestable (estable tras calentamiento a 121°C durante 2 horas) que forma parte del lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana externa de la pared celular (Blanco *et al.*, 2002).
- Los antígenos capsulares (K) o de superficie corresponden con el polisacárido capsular que envuelve la pared celular y enmascara el antígeno O inhibiendo su aglutinación. Hay 2 variedades, K (L) que se inactiva tras el calentamiento a 100°C durante 1 hora y K (A) para los que son necesarias exposiciones a 121°C durante 2 horas (Blanco *et al.*, 2002).
- Los antígenos flagelares (H) son proteínas termolábiles, se inactivan por calor a 100°C durante 30 minutos (Blanco *et al.*, 2002).
- También existen los antígenos fimbriales (F), implicados en la adhesión a las células hospedadoras (Barnes *et al.*, 2003).



**Figura 2.1** Principales antígenos de superficie (O, K, H y F) en *E. coli* (Blanco et al., 2002)

Las diferentes cepas de *E. coli* poseen varios tipos de antígenos principales (Figura 2.1), que tienen una clara aplicación diagnóstica, de identificación y taxonómica (Le Minor, 1992; D'Aoust, 1997; Old y Threlfall, 1998). Actualmente tienen más de 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno "O" es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo. Hasta ahora se han reconocido más de 700 serotipos de *E. coli*. Algunos serogrupos y serotipos se asocian con determinados síndromes clínicos, pero la identificación de cepas patógenas depende de la detección de determinados factores de virulencia que se encuentran frecuentemente alojados en elementos genéticos móviles que pueden pasar de unas cepas a otras dando lugar a nuevas combinaciones de factores de virulencia (Kaper *et al.*, 2004; Welch, 2006; Elizaquível *et al.*, 2011). Con base a los serotipos se pueden clasificar en grupos patógenos por sus diferentes factores de virulencia que presentan y por las enfermedades que causan, debido a que han adquirido genes de virulencia específicos, han permitido adaptarse a nuevos nichos y actúan conjuntamente para potenciar su patogenicidad,

produciendo infecciones y síndromes, ampliando su espectro de enfermedades en el hombre (Blanco *et al.*, 2002).

### 2.3 Grupos patógenos de *E. coli*

Existen seis grupos patógenos o patotipos:

- *E. coli* enteropatógena (ECEP).

La clasificación de las cepas de ECEP comprende aquellas que causan la lesión de adhesión y borrado (*A/E-attaching and effacing*) de las microvellosidades de los enterocitos (Margall *et al.*, 1997) y que no producen verotoxinas (Levine *et al.*, 1987). La adhesión a células intestinales está relacionada con la expresión de la fimbria BFP (*Bundle Forming Pilus*), necesaria para la producción de diarrea. La adherencia está medida por pilis o fimbrias rizadas, cuya información genética está codificada en un plásmido denominado EAF (*ECEP adherence factor*) y de algunos genes cromosomales. El cuadro clínico que produce ECEP se manifiesta con diarrea aguda, la cual puede ser leve o grave, con vómito, fiebre baja y mala absorción (Rodríguez Ángeles, 2002; Trabulsi *et al.*, 2002; Welch, 2006; Elizaquível *et al.*, 2011).

- *E. coli* enterotoxigénica (ECET).

Junto con ECEP son los patógenos responsables de la diarrea del viajero o de origen alimentario por alimentos importados, muy frecuente en países subdesarrollados (Todar, 2008). Se adhiere a la mucosa del intestino delgado, no la invade, y se produce la liberación de enterotoxinas (termolábil “LT” y termoestable “ST”), siendo esta el principal factor de virulencia (Kaper *et al.*, 2004; Welch, 2006; Elizaquível *et al.*, 2011). En el hombre se produce una diarrea líquida profusa, sin sangre ni material purulento y ausencia de fiebre

(Margall et al., 1997). Junto con ECEP son los patógenos responsables de la diarrea del viajero o de origen alimentario por alimentos importados, muy frecuente en países subdesarrollados (Todar, 2008).

- *E. coli* enteroinvasiva (ECEI).

El grupo ECEI y *Shigella spp.* se encuentran relacionados genética y bioquímicamente. Se asocia fundamentalmente con brotes de origen alimentario por alimentos importados (Margall et al., 1997), siendo responsables de la “diarrea del viajero”. El mecanismo de patogenicidad de ECEI es la invasión del epitelio del colon, sin producción de toxinas LT y ST, dando lugar a una diarrea disenteriforme acuosa que se manifiesta con sangre y mucosidad en heces acompañado de fiebre y dolor abdominal (Todar, 2008). En algunos casos sólo se produce diarrea, siendo difícil diferenciarla de la producida por ECET (Rodríguez-Angeles, 2002; Kaper et al., 2004; Welch, 2006; Elizaquível et al., 2011).

- *E. coli* enteroagregativo (ECEA).

Se definen como aquellas que no secretan enterotoxinas termolábiles ni termoestables y adhieren a células HEp-2 en un patrón agregativo, reconocido por su auto aglutinación en forma de “ladrillos apilados”. Esta definición abarca tanto cepas patogénicas como no patogénicas por lo que aún se encuentra en estudio cuáles los factores responsables de la virulencia en ciertas cepas (Elizaquível et al., 2011).

- *E. coli* de adherencia difusa (ECAD).

Puede dar lugar a diarrea en niños menores de un año y se diferencia de otros *E. coli* diarreagénicos por su inconfundible fenotipo de adhesión a células Hep-2. Esta adhesión es provocada por la fimbria F1845, perteneciente a la familia

de las adhesinas, que reconoce y se une al DAF (*Decay-Accelerating Factor*), factor que normalmente protege a las células de posibles daños (Kaper *et al.*, 2004; Welch, 2006; Elizaquível *et al.*, 2011).

- *E. coli* enterohemorrágica (ECEH).

Es un subgrupo dentro de las denominadas *E. coli* productoras de toxina Shiga. Las ECEH o también denominadas STEC (*Shiga toxin-producing E. coli*) son cepas productoras de estas toxinas que llevan el nombre toxina “Shiga” porque fueron originalmente halladas en cepas de *Shigella dysenteriae*. Este grupo de bacteria se asocia a brotes de colitis hemorrágica y es considerado el principal agente causal del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Dentro de los serotipos denominados colectivamente *E. coli* enterohemorrágicos, como el O26:H11, O111:H-, O145:H-, O45:H2, O128:H-, O4:H-, O103:H2, O157:H7 ó H- son los responsables de los cuadros clínicos más graves (Beutin *et al.*, 1993; Margall *et al.*, 1997).

#### **2.4 Factores de virulencia de *E. coli* O157:H7**

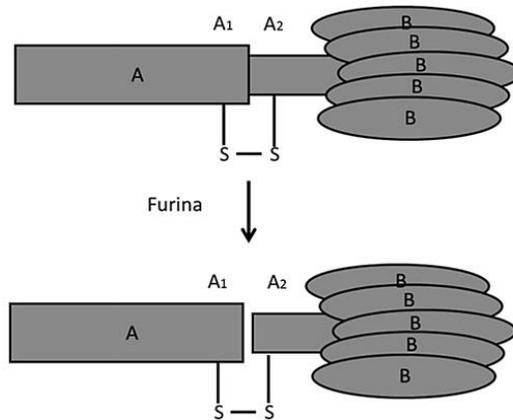
Los factores de virulencia típicos, que se encuentran en todas las *E. coli* O157:H7, son la capacidad de producir toxinas Shiga (Stx), también denominadas verocitotoxinas (Vts) por ser factores citotóxicos para células renales de mono verde africano (células Vero), la producción de lesiones de adhesión y borrado o lesiones de A/E, la presencia de un plásmido denominado pO157 y las estructuras externas de la bacteria: el lipopolisacárido (LPS) y la cápsula o exopolisacárido (EPS).

### 2.4.1 Toxinas Shiga

Estas potentes citotoxinas, consideradas el principal factor de virulencia de ECEH que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas. Existen dos tipos de Stx denominadas Stx1 y Stx2. La molécula de la toxina Stx1, idéntica a la toxina Shiga tipo 1 producida por *Shigella dysenteriae*, presenta tres variantes antigénicas o subtipos (Stx1a, Stx1c y Stx1d), mientras que en el caso de la toxina Stx2 existen siete subtipos (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f y Stx2g). Las cepas que producen la toxina Stx2 (más la presencia del gen *eae*) tienen mayor probabilidad de producir SUH que las que producen la toxina Stx1 o ambas. Concretamente los subtipos Stx2a, Stx2c y Stx2d son los más asociados con patologías graves en enfermedad humana (Gyles, 2007; Bergan *et al.*, 2012; Farrokh *et al.*, 2013).

Las toxinas Shiga están compuestas por dos partes, denominadas A y B (Figura 2.2). B es una parte conductora que identifica y se une específicamente a las células blanco, y A es una parte catalítica que inactiva irreversiblemente a los ribosomas.

La mitad A posee dos dominios proteínicos denominados A1 y A2. La mitad B consiste en cinco subunidades idénticas denominadas subunidades B que forman un pentámero; cada una de las subunidades B de 7.500 Da es capaz de unirse a la globotriaosil ceramida (Gb3) que es el receptor natural de Stx1 y Stx2, aunque Stx2 puede unirse también a Gb4 (Sandvig *et al.*, 2010).



**Figura 2. 2** Hidrólisis por furina de la parte A de las toxinas Shiga. La furina hidroliza la cadena polipeptídica en la secuencia RXXR que se localiza entre ambos fragmentos que permanecen unidos por un enlace disulfuro (Garred *et al.*, 1995).

La mitad A posee una masa molecular relativa aparente de aproximadamente 32.000 Da y posee actividad inhibidora de biosíntesis de proteínas. Para activarse necesita escindirse en los dos dominios A1 de 27.000 Da y A2 de 4.000 Da.

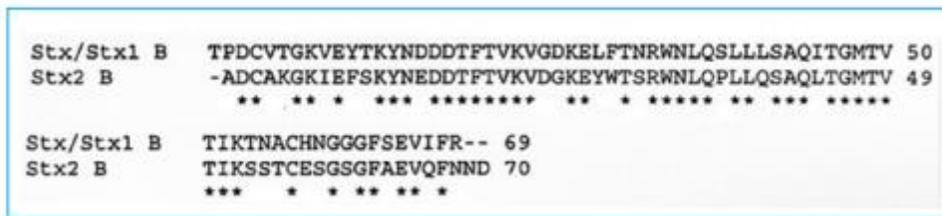
Posteriormente, el fragmento A1 necesita acceder al citosol e inactivar a los ribosomas. Este proceso proteolítico lo lleva a cabo específicamente una proteasa denominada furina (Gordon y Leppla, 1994). La furina reconoce la secuencia RXXR que se localiza entre ambos fragmentos, pero después de la hidrólisis siguen unidos gracias a la existencia de un enlace disulfuro que las mantiene unidos (Garred *et al.*, 1995) hasta su llegada al retículo endoplásmico (RE), donde se producirá la rotura de este enlace debido a las condiciones reductoras del RE. El fragmento A1 liberado es entonces trasladado al citosol donde ejercerá su acción citotóxica inactivando los ribosomas, al eliminar una adenina de la región 3' del rARN 28S. Como resultado se inhibe la síntesis proteica e incluso puede producirse la apoptosis de la célula (Gyles, 2007; Bergan *et al.*, 2012). El proceso de hidrólisis transcurre a un pH bajo propio de los endosomas tempranos que son acidificados por introducción de H<sup>+</sup> mediante una ATP-asa de tipo V (Moriyama y Nelson, 1988).

La cadena A de las Stx varía poco y guarda cierta homología secuencial de aminoácidos entre las cuatro proteínas en las zonas de plegamiento y en el sitio activo (Figura 2.3).

Stx A	----KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTG	46
Stx1 A	----KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG	46
Stx2 A	----REFTIDFSTQQSYVSSLNSIRTEISTPLEHISQGTTSVSVINHTPP	46
Ricin A	IFPKQYPIINFTTAGATVQSYTNFIRAVRGRLLTTGADVREIIPVLPNRVG	50
	* * * * *	
Stx A	DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRNNTNVFYR----	91
Stx1 A	DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRNNTNVFYR----	91
Stx2 A	GSYFAVDIRGLDVYQARFDHLRLIIEQNNLYVAGFVNTATNTFYR----	91
Ricin A	-LPINQRPIILVELSNHAELSVTLALDVTNAYVVGYRAGNSAYFFHPDNQE	99
	* * * * *	
Stx A	-FADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLLTTSYL	140
Stx1 A	-FADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLLTTSYL	140
Stx2 A	-FSDFTHISVPGVTTVSMTTDSSYTTLQRVAALEERSGMQISRHSLSVSYL	140
Ricin A	DAEAITHLFTDVQNRYYTFAFGGNYDRLEQLAGNLRENIELGNGLPEEAI	149
	* * * * *	
Stx A	DLMSHS-GTSLTQSVARAMLRFVTVTAELRFRQIQRGFRITLDDLGRS	189
Stx1 A	DLMSHS-GTSLTQSVARAMLRFVTVTAELRFRQIQRGFRITLDDLGRS	189
Stx2 A	ALMEFS-GNTMTRDASRAVLRVTVTAELRFRQIQREFRQALSETAP-V	188
Ricin A	ALYYYSTGGTQLPTLARSFIICIQMISEAARFQYIEGEMRTRIRYNRR--	197
	* * * * *	
Stx A	YVMTAEDVDLTLNWGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALI	239
Stx1 A	YVMTAEDVDLTLNWGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALI	239
Stx2 A	YTMTPGDVDLTLNWGRISNVLPDYRGEQDGVVGRISFNNISAILGTVAVI	238
Ricin A	SAPDPSVITLENSWGRLLSTAIQESN--QGAFASPIQLQRN--GSKFSV	242
	* * * * *	
Stx A	LNCHHHASRVARMASDEFPSMCPADGRVGRGITHNKILWDSSTLGAILMRR	289
Stx1 A	LNCHHHASRVARMASDEFPSMCPADGRVGRGITHNKILWDSSTLGAILMRR	289
Stx2 A	LNCHHQGARSVRVAVNEESQPECQITGDRPVKINNTLWESNTAAAFLNK	288
Ricin A	YDVSILIPIIALMVYRCAPPSSQF-----	267
Stx A	----TISS	293
Stx1 A	----TISS	293
Stx2 A	SQFLYTTGK	297
Ricin A	-----	

**Figura 2. 3** Estructura primaria de las cadenas catalíticas (A) de las toxinas Shiga de *S. dysenteriae* (Stx), *E. coli* (Stx1 y Stx2) y ricina. Las secuencias de aminoácidos han sido deducidas de la secuencia nucleotídica de los genes. Los asteriscos indican la posición de aminoácidos idénticos (Fraser *et al.*, 2004).

Respecto a las cadenas B, la toxina Stx1 tienen la misma cadena polipeptídica que la toxina de *Shigella dysenteriae* denominada “Shiga toxin” o Stx, mientras que existen pequeñas diferencias entre estas cadenas B de Stx y Stx1 con la cadena B de Stx2 (Figura 2.4).



**Figura2. 4** Estructura primaria de las cadenas B de las toxinas *Shiga* de *S. dysenteriae* (Stx) y de *E. coli* (Stx1 y Stx2). Las secuencias de aminoácidos han sido deducidas de la secuencia nucleotídica de los genes. Los asteriscos indican la posición de aminoácidos idénticos (Fraser *et al.*, 2004).

Los genes que codifican las toxinas Shiga se encuentran localizados en el genoma de bacteriófagos lamboides denominados fagos-Stx. Estos fagos constituyen un grupo heterogéneo de elementos genéticos altamente móviles que pueden insertarse en sitios de unión específicos del cromosoma. Los fagos-Stx de cepas STEC pueden incluso infectar bacterias comensales del intestino, haciendo que puedan producir Stxs y por tanto agravando la enfermedad. Otra característica importante de los fagos-Stx es su estabilidad en el ambiente durante largos periodos de tiempo, pudiendo, como ya se ha dicho, insertarse en bacterias convirtiéndolas en productoras de toxinas Stxs (Bergan *et al.*, 2012).

#### 2.4.2 Adherencia: formación de la lesión de A/E

La lesión de A/E se caracteriza por la fijación de las bacterias a las células intestinales con separación de las microvellosidades, y acumulación de actina filamentosa en el citoplasma subyacente que resulta en la formación de estructuras denominadas “pedestales” sobre las cuales se produce la adhesión íntima de la bacteria a la célula. Los genes necesarios para la formación la lesión de A/E se encuentran en la isla de patogenicidad LEE (del inglés: locus of enterocyte effacement) de aproximadamente 50kb que se encuentra dentro del cromosoma de la bacteria. Ésta isla de

patogenicidad tiene al menos 41 genes diferentes organizados en 3 regiones principales:

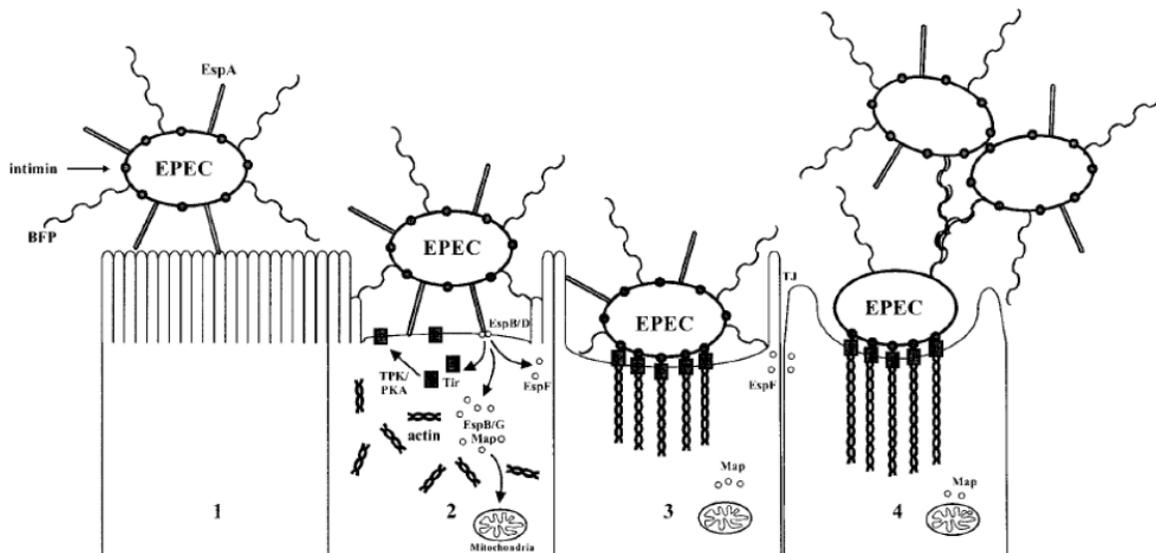
- Un sistema de secreción tipo III (SSTIII) que exporta las moléculas efectoras.
- El operón *tir* que codifica para la intimina (una adhesina de la superficie de la bacteria), y para el receptor de la intimina que se trasloca a la superficie de la célula epitelial a través del SSTIII.
- La producción de proteínas que se secretan a través del SSTIII y que están involucradas en la modificación de la transducción de señales celulares durante la formación de la lesión de A/E.

Las secuencias de los LEE de ECEH O157:H7 y de ECEP O127:H6 son prácticamente iguales, difieren sólo en la presencia de un profago de 7,5 kb en el LEE de ECEH. El tipo de lesión producida por ambas bacterias es igual, pero ECEP (también nombrada EPEC) produce la lesión principalmente en el intestino delgado mientras que las lesiones producidas por ECEH se presentan predominantemente en el intestino grueso.

El modelo de infección planteado por Clarke *et al.* (2003) para ECEP (Figura 2.5) presenta cuatro pasos:

- 1) Producción, bajo las condiciones ambientales correctas, de una fimbria (Bfp), intimina y filamentos de superficie (EspA) para producir la primer interacción con la célula
- 2) La bacteria, vía Bfp y EspA, por un SSTIII introduce el receptor traslocado de intimina (Tir) y un número aún no determinado de moléculas efectoras dentro de la célula eucariota. Estas moléculas efectoras activan las vías de señalización celular causando alteraciones en el citoesqueleto de la célula que resultan en la polimerización de la actina y pérdida de las microvellosidades. Tir se modifica en el interior de la célula a través de una proteína quinasa A y una tirosina proteína quinasa y se inserta en la membrana del huésped.

- 3) Los filamentos EspA se pierden de la superficie de la bacteria y la adhesina intimina se une al Tir modificado generando una adhesión íntima entre la célula y la bacteria. Debajo del sitio de unión se produce acumulación de actina y otros elementos del citoesqueleto.
- 4) La acumulación de elementos del citoesqueleto debajo de la unión bacteria-célula produce las estructuras características en forma de pedestal y muerte celular inducida por la acción de las moléculas efectoras introducidas en la célula. El mecanismo propuesto se esquematiza a continuación:



**Figura 2. 5** Esquema de 4 pasos planteado por Clarke *et al.*, 2003.

### 2.4.3 Plásmido pO157

*E. coli* O157:H7 contiene un plásmido denominado pO157, con un tamaño de 92 kb (Burland *et al.*, 1998). El plásmido pO157 lleva genes que codifican un tipo de Hemolisina en ECEH, la cual puede causar lisis de células endoteliales microvasculares humanas y apoptosis, y es probable que contribuyan a la patogénesis del serotipo O157:H7 (Bielaszewska *et al.*, 2014). El plásmido también codifica genes

para factores de virulencia putativos Citotoxina B (toxB), una serina proteasa (espP) y una catalasa / peroxidasa (katP) (Burland et al., 1998; Rump *et al* 2012), así como los componentes de un sistema de secreción de tipo II (etp operon) (Schmidt *et al.*, 1997).

#### **2.4.4 LPS y cápsula**

Clásicamente el LPS y la cápsula son considerados factores de virulencia debido a que protegen a la bacteria de muchos factores de defensa del huésped. Además existe evidencia de que estos polisacáridos de superficie no sólo inducen la respuesta inflamatoria innata del huésped sino que también la bacteria es capaz de modular esa respuesta de manera que le resulte ventajosa (Donnenberg, 2002). Otro aporte a la virulencia fue reportado por Shifrin *et al.* (2008) quienes encontraron que la producción de cápsula del grupo 4 es necesaria para la eficiente colonización del intestino grueso de conejos.

Los aislados de *E. coli* que causan infecciones intestinales tienen cápsulas pertenecientes a los grupos 1 y 4, las del grupo 1 son polisacáridos acídicos que típicamente contienen ácidos urónicos, las del grupo 4 tienen estructuras diversas (Donnenberg, 2002).

#### **2.5 *E. coli* O157:H7**

En relación con la salud pública, la *E. coli* (O157:H7) es el serotipo ECEH más importante ligado a las enfermedades transmitidas por los alimentos, lo que se traduce en una alta incidencia de infecciones y muertes por cada año (FAO). *E. coli* del serotipo O157:H7 fue reportado por primera por Karmali en 1983, en donde afectó a 47 personas las cuales consumieron hamburguesas poco cocidas en Estados Unidos (Acheson 1996; Mattar *et al.*, 2001). La asoció con casos aislados de Síndrome

Urémico Hemolítico (SUH) caracterizado por daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, precedida por diarrea con sangre, con la presencia de heces con *E. coli* productora de una citotoxina con actividad sobre células Vero, por lo que se le llama verotoxina (VT), y a las cepas capaces de producirla se les denominó *E. coli* verotoxigénicas (Konowalchuk *et al.*, 1977; Masana *et al.*, 2010; Karmali *et al.*, 2010).

En 1996, hubo un brote de *E. coli* O157:H7 en Japón, que afectó a más de 6,300 niños y produjo 2 muertes. Éste es el brote más grande registrado para este patógeno (OMS, 1996). El 12 de octubre del 2006 por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) y el Estado de California reportaron un brote de *E. coli* O157:H7 el cual se detectó en una finca de espinacas, dicho brote era proveniente de la materia fecal de ganado de dicha finca. Según los casos reportados por el Centro de Control de Enfermedades (CDC), la espinaca contaminada por esta cepa ocasionó que 204 personas enfermaran, entre los cuales se incluyen 31 casos de un tipo de insuficiencia renal denominado Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), 104 hospitalizaciones y 3 defunciones (FDA, 2006).

En Estado Unidos se presentan al año 73,000 casos diarreicos y 40 muertes causados por ECEH O157:H7. Uno de los brotes recientes causado por *E. coli* O157:H7 fue reportado el 4 de enero del 2010 en 16 estados de los Estados Unidos. Según los casos reportados por el Centro de Control de Enfermedades (CDC), la carne de vacunos y aves contaminadas por esta cepa ocasionó que 21 personas enfermaran, entre los cuales incluyen 1 caso de un tipo de insuficiencia renal denominado Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y 9 hospitalizaciones (CDC, 2010). Y el brote más reciente reportado en el año 2011 en el mes de mayo en Alemania y Suecia. Según los casos reportados por el Centro de Control de Enfermedades (CDC), el posible origen del contagio ha sido atribuido al germinado de soya, donde los últimos datos sobre la epidemia revelan que 3235 personas han contraído la enfermedad, el 69% de ellas mujeres. Más de 700 alemanes siguen internados en hospitales al haber desarrollado el (SUH) (CDC, 2011).

La incidencia de ECEH varía según los países. En 2004, el número de casos confirmados mediante pruebas de laboratorio en la Unión Europea (17 Estados Miembros) y Noruega fue de 1.3 por 100 000 habitantes. En 2001, en Nueva Zelanda se notificaron 2 casos por 100 000 habitantes y en Australia 0.2 casos por 100 000 habitantes.

## **2.6 México y países en desarrollo**

En países en desarrollo los estudios sobre el papel de las *E. coli* patógenas intestinales en la EDA (Enfermedad Diarreica Aguda) son limitados debido a la carencia de los recursos económicos y las faltas de ensayos para detección de estos patógenos en los laboratorios clínicos de centros de salud pública, siendo sólo reportados en su mayoría como cuadros diarreicos severos. Las enfermedades diarreicas son una causa principal de mortalidad y morbilidad en la niñez en el mundo y por lo general son consecuencia de la exposición a alimentos o agua contaminados (González-Núñez, 2011).

Estudios recientes han reportado la detección de ECEH en Colombia (Gómez-Duarte, 2014), en Brasil y Argentina se han reportado la presencia de este serotipo en aislados clínicos de infantes, siendo en este país último el principal serotipo dominante, en el que la incidencia de SUH está por encima de la media nacional, con un máximo de 28,006 casos por cada 100, 000 en niños menores de 5 años de edad reportados en 1998 (Regua-Mangia *et. al.*, 2012; Pianciola *et al.*, 2014).

En México, la mayoría de los cuadros diarreicos son de naturaleza infecciosa (Vásquez-Arroyo y Cabral-Martell, 2001). En nuestro país, el sistema nacional de vigilancia epidemiológica solo distingue una categoría en relación a enfermedades transmitidas por alimentos, la intoxicación bacteriana. Por desgracia existe limitada información sobre la frecuencia de estos agentes patógenos en los alimentos que

consumimos en México o en aquellos que se exportan. Durante el periodo de 1980 a 1989, el Laboratorio Nacional de Salud Pública, confirmó 58 brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario a nivel nacional (Parrilla-Cerrillo, *et al.*, 1993). En el año 2002, el Sistema Nacional de Información en Salud reportó, 3612 casos de intoxicaciones alimentarias de origen bacteriano, de los cuales 173 se presentaron en el estado de Sinaloa (Díaz, 2003). En el año 2005 en México, se produjeron 5.9 millones de casos de enfermedades intestinales, el 13.8% del total de padecimientos registrado al nivel nacional, ocupando el segundo lugar luego de las enfermedades respiratorias (DGEPI, 2006). Teniendo en cuenta que la diarrea es la principal enfermedad en México y en países en desarrollo y siendo la bacteria *E. coli* relacionada a esta enfermedad, es evidente el impacto que tienen y pueden producir secuelas importantes.

## **2.7 Resistencia de *Escherichia coli* a los antibióticos**

En los últimos años, se ha observado un aumento de la resistencia a los múltiples antibióticos en bacterias Gram-negativos representando un problema diario para el tratamiento de la terapia antimicrobiana en pacientes infectados con algún tipo de *enterobacterias* (Ruppe *et al.*, 2015). Estudios han reportado que los principales antibióticos de uso clínico, las cuales son usadas para el tratamiento de infecciones causadas por las cepas patógenas de *E. coli* como la ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, ciprofloxacina, tetraciclina y estreptomina, entre otras tanto en cepas de origen humano y animal como las aisladas del ambiente (agua y suelos), han generado resistencia sobre éstos antibióticos (Alzahrani *et al.*, 2011, Harada y Asai, 2010, Chandran *et al.*, 2008). Esto debido a la utilización masiva y el uso indiscriminado lo cual ha provocado un aumento en su resistencia a nivel mundial (Turner *et al.*, 2006). Como por ejemplo la mayoría de las aguas residuales que contienen antibióticos se vierten a los desagües y van a parar a ambientes acuáticos,

lo cual contribuye a la selección de microorganismos con patrones de multirresistencia a antibióticos. Las bacterias presentes en estos ecosistemas se ven expuestas a diferentes presiones selectivas, adaptándose a su entorno para su supervivencia, lo que favorece la resistencia antimicrobiana en bacterias Gram-negativas. Ésta resistencia resulta de la expresión de enzimas de inactivación a los antibióticos y mecanismos no enzimáticos (Alekhun y Levy, 2007). Ambos pueden ser intrínsecamente expresados por una especie dada (genes cromosómicos) o adquiridos por un subconjunto de cepas como consecuencia de dos eventos genéticos distintos aunque no mutuamente exclusivos:

1. Las mutaciones en los genes cromosómicos que resultan en un aumento en la expresión de mecanismos de resistencia intrínseca (enzimas inactivadoras de antibióticos o bombas de expulsión), alteraciones de permeabilidad por pérdida de poros de membrana externa o modificaciones de diana.
2. Transferencias de elementos móviles genéticos que llevan genes de resistencia, lo más notablemente plásmido de codificación de beta-lactamasas, aminoglucósidos modificadores de enzimas o mecanismos no enzimáticos tales como Qnr para la resistencia a fluoroquinolona en *Enterobacteriaceae*. Puesto que estos plásmidos soportan comúnmente múltiples determinantes de resistencia, una única conjugación de plásmido puede ser suficiente para conferir un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos a la cepa receptora. (Ruppe *et al.*, 2015).

## **2.8 Tratamiento contra *E. coli* Enterohemorrágica**

El tratamiento de la infección por *E. coli* ECEH es completamente de sostén y puede incluir líquidos y una dieta blanda. Se ha discutido mucho acerca de las ventajas y desventajas del uso de antibióticos durante las diarreas debidas a ECEH. Los

antibióticos son controvertidos y, generalmente, se los evita. Ya que estudios clínicos previos no han demostrado efecto beneficioso con el tratamiento antibiótico ya que pueden inducir la expresión y liberación de la toxina y aumentar el riesgo de SUH (Romina *et al.*, 2011)

El tratamiento antibiótico sólo estaría indicado en pacientes críticos o graves que cursan con Sepsis Severa o Shock Séptico:

- por sospecha de enfermedad invasiva por *E. coli*.
- por sobreinfección por otros gérmenes.

Aunque las infecciones por ECEH no suelen ser tratadas de forma agresiva con terapia antimicrobiana y muchas cepas son susceptibles a un gran número de antibióticos, estudios recientes demuestran que cepas bacterias patógenas están aumentando la resistencia a los antibióticos de uso clínico (Schroeder *et al.*, 2002; Mora *et al.*, 2005; Carone *et al.*, 2014).

Por lo que surge la necesidad de buscar compuestos activos para combatir contra microorganismos patógenos, como es el caso de derivados de los antibióticos ya existentes, no obstante estos al ser un compuesto puro solo poseen un único mecanismo de acción. En los últimos años, los médicos y científicos han investigado productos de origen natural tales como la miel, como un medio de la búsqueda de alternativas frente a las enfermedades infecciosas, debido a que la miel es una sustancia muy compleja con más de 200 componentes y es posible que contenga uno o más compuestos que bloquean la capacidad de una bacteria para desarrollar resistencia a la miel (Cooper *et al.*, 2000). La miel de Melipona ha demostrado que inhibe el crecimiento microbiano y tiene mayor eficacia como agente terapéutico en comparación con la miel producida por la abeja *Apis mellifera* (Quezada-Euán *et al.*, 2005).

## 2.9 Miel de *Melipona beecheii*

La miel es una sustancia natural producida por las abejas a partir del néctar de las flores o de otras partes de una planta. Está conformada por una gran diversidad de compuestos tales como, carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas, compuestos polifenólicos y también contiene otros compuestos, en menor cantidad, tales como, aminoácidos, minerales y vitaminas (Bogdanov *et al.*, 2008).

La miel de Melipona, uno de los tantos tipos existentes de miel, es producida por la *Melipona beecheii*, la cual es una abeja sin aguijón nativa de la península de Yucatán. Esta abeja se encuentra entre las 400 especies de abejas existentes en el trópico y subtrópico además de ser una de las dieciséis especies de abeja sin aguijón, de la familia Meliponinae (Melipona y Trigona en su mayoría) que habitan en el estado de Yucatán (Heard, 1999).

Una de las características medicinales atribuidas a la miel de abeja sin aguijón es su capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras del género *Candida* y otros microorganismos que son patógenos para los seres humanos.

Los mayas también utilizaron la miel de abejas *Melipona beecheii* como agente antiséptico y como remedio para las infecciones de las vías respiratorias como laringitis, sinusitis y bronquitis (Carrillo, 1990). Otros usos terapéuticos atribuidos a este tipo de miel son las siguientes: en el tratamiento de las cataratas y el crecimiento ocular, como coadyuvante en el tratamiento de conjuntivitis infecciosas y traumáticas, úlceras oculares (Molan, 1992).

### 2.9.1 Actividad antimicrobiana de la miel.

La actividad antimicrobiana de la miel es una de las características más importantes que posee este alimento, la cual es generada por la gran variedad de compuestos que la conforman mencionadas anteriormente.

En años recientes se ha reportado, especialmente en la miel de *Apis mellifera*, la presencia de los componentes que posiblemente influyen sobre la actividad antimicrobiana. Entre los factores reportados con efecto inhibitorio se encuentran:

- Peróxido de hidrógeno
- Acidez (ácido glucónico)
- Compuestos fenólicos
- Enzimas (glucosa oxidasa, proteasas, amilasas)
- Proteínas y péptidos antimicrobianos.

(Molan, 1999; Estrada *et al.*, 2005; Mendieta, 2006; Alvarez-Suarez *et al.*, 2010; Kwakman *et al.*, 2011; DebMandal y Mandal, 2011).

Diversos trabajos han demostrado la eficacia de la miel contra las bacterias Gram-positivas, tales como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus avium*, *Corynebacterium* género, género *Micrococcus*, y género *Streptococcus* (Cooper *et al.*, 1999; Sheikh *et al.*, 1995) y Gram-negativas bacterias tales como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, y *Shigella dysenteriae* (Molan, 1999; Malu *et al.*, 2004).

El método cualitativo más utilizado para la evaluación de la actividad antimicrobiana es el de difusión en disco; Sin embargo, el método de macrodilución también se utiliza con frecuencia, ya que es posible calcular la concentración mínima inhibitoria (CMI) que refleja la cantidad necesaria para la inhibición del crecimiento microbiano (Chan-Rodríguez *et al.*, 2012).

Actualmente existen una serie de informes de mieles de *Apis* (miel de abeja con aguijón) que presentan actividad antimicrobiana. (DebMandal y Mandal, 2011; Tan *et al.* 2009). Como por ejemplo existen estudios donde reportan concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de miel contra microorganismos patógenos como se observa en la Tabla 2.1

**Tabla 2. 1** Concentración mínima inhibitoria de diferentes tipos de miel contra los microorganismos de importancia media.

<b>Tipo de miel</b>	<b>CMI (%)</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Referencia</b>
<i>Apis mellifera</i> Manuka ( <i>Leptospermum scoparium</i> )	3.4 - 20	<i>S. pyogenes</i> , <i>Staphylococci</i> , MRSA, <i>S. aureus</i> , <i>S.</i> <i>maltophilia</i> , <i>A.</i> <i>baumannii</i> , <i>E. coli</i> <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> , <i>S. typhi</i>	DebMandal y Mandal (2011)
<i>Apis mellifera</i> pasto	3.6 ± 0.7	Coagulase-negative <i>Staphylococci</i>	French <i>et al.</i> (2005)
<i>Apis mellifera</i> Egyptian clover ( <i>Trifolium alexandrinum</i> )	35 - 40	<i>A. schubertii</i> , <i>H.</i> <i>paraphrohaemlyticus</i> , <i>M.</i> <i>luteus</i> , <i>C.cellulans</i> , <i>L.</i> <i>anguillarum. baumannii</i>	Badawy <i>et al.</i> (2004)
<i>Apis mellifera</i> (diferente flora)	2.5 - 50	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S.</i> <i>aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>C.</i> <i>albicas</i>	Kuncic <i>et al.</i> (2012) Alzahrani <i>et al.</i> (2012)
<i>Apis dorsata</i> Tualang ( <i>Koompassia excelsa</i> )	8.75 - 25	<i>S. pyogenes</i> , <i>Staphylococci</i> , MRSA, <i>S. aureus</i> , <i>S.</i> <i>maltophilia</i> , <i>A.</i> <i>baumannii</i> , <i>E. coli</i> y <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> , <i>S. typhi</i> , <i>E.</i> <i>cloacae</i>	Tan <i>et al.</i> (2009)
<i>Apis dorsata</i> Nilgiri	25, 35 y 40	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i>	Rajeswari <i>et al.</i> (2010)
<i>Melipona beecheii</i> flora desconocida	4 - 5	<i>S. aureus</i> , <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>	Chan-Rodríguez <i>et al.</i> (2012)

Son muy pocos los trabajos donde han reportado la actividad antibacteriana de la miel de *Melipona* específicamente de *Melipona beecheii* contra *E. coli* O157:H7 y *E. coli* ATCC 25922. Como por ejemplo: Dardon y Enriquez en el (2008) evaluaron la concentración mínima inhibitoria de mieles de abejas de la especie *Melipona salani*, *Melipona beecheii*, y *Melipona yucatanica* contra diferentes bacterias entre éstas se evaluó *E. coli* ATCC 25922. La miel de *Melipona salani* no inhibió el crecimiento en dilución de 10% (v/v) mientras que las mieles de *Melipona beecheii*, y *Melipona yucatanica* en diluciones del 5 % (v/v) inhibió el crecimiento de ésta bacteria.

Zamora y Arias en el 2010 reportan la actividad antimicrobiana de 30 muestras de mieles de abeja sin aguijón (no especifica las especies de abejas) contra dos cepas de *E. coli* tanto en forma pura como diluida como se aprecia en la Tabla 2.2. El 73 % de las mieles evaluadas inhibió el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 usando 100 % de miel y para el caso en contra de *E. coli* O157:H7 el 87 % de las mieles evaluadas inhibió el crecimiento usando miel al 100%.

**Tabla 2. 2** Actividad antimicrobiana de miel de abeja sin aguijón contra *E.coli*.

	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>E. coli</i> O157:H7
Concentración Miel	% de mieles que presentaron inhibición de crecimiento microbiano	
100%	73	87
75%	40	70
50%	17	33
25%	-	3
12.5	-	-

. – (no presentó inhibición de crecimiento) (Zamora y Arias en el 2010)

### Capítulo 3 Justificación

Las enfermedades transmitidas por alimentos representan un problema a nivel mundial, siendo la diarrea la enfermedad más común representando la segunda causa global de mortalidad en niños en países en desarrollo y *E. coli* es la bacteria más frecuentemente asociada a los cuadros clínicos de estas enfermedades. Esta bacteria es una de las especies predominantes en el intestino del humano y usualmente coexiste sin causar daño al hospedero, pero sin embargo han emergido categorías de *E. coli* patogénicas, las cuales son clasificados en base a sus factores de virulencia, siendo la *E. coli* O157:H7 la que produce mayor daño y además presenta una alta incidencia de infecciones cada año. Debido a que es productora de toxinas Shiga, siendo el principal serotipo asociado a brotes de colitis hemorrágicas considerándose el principal agente causal del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). En los últimos años, se ha observado un aumento de resistencia de ésta especie a los principales antibióticos del uso clínico para el tratamiento de infecciones causadas por cepas patógenas, pero otro problema es que al lisar la bacteria por agentes antimicrobianos se liberan más toxinas Shigas aumentando la concentración de éstas en el huésped llevándolo a su muerte. Desde la antigüedad los antiguos mayas utilizaban la miel de *Melipona beecheii* como medicina para el tratamiento de diversas enfermedades y diversos estudios han demostrado que la miel tiene capacidad antimicrobiana. El cual puede ser considerado una alternativa de origen natural contra cepas patógenas virulentas. Por lo que en este trabajo se pretende evaluar la capacidad antimicrobiana de la miel de *Melipona* contra *E. coli* O157:H7 así como evaluar los niveles de expresión de los genes virulencia en presencia de extractos proteicos y fenólicos de la miel de *Melipona beecheii*.

## Capítulo 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Evaluar los niveles de expresión de los genes de virulencia de *E. coli* O157:H7 en presencia de extractos proteicos y fenólicos de la miel de *Melipona beecheii*.

### 4.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto inhibitorio de la miel de *Melipona beecheii* contra *E. coli* O157:H7 y *E. coli* ATCC 25922.
- Evaluar el efecto antimicrobiano de los extractos proteicos y fenólicos de la miel de *Melipona beecheii* contra *E. coli* O157:H7 y *E. coli* ATCC 25922.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de la miel de *Melipona beecheii* y de los extractos proteicos y fenólicos contra *E. coli* O157:H7 y *E. coli* ATCC 25922. .
- Determinar los niveles de expresión de las toxinas Stx1 y Stx2 de *E. coli* O157:H7 expuesta a concentraciones subletales de la miel de *Melipona beecheii* utilizando PCR tiempo real.

## Capítulo 5 Hipótesis

La miel de *Melipona beecheii* y sus compuestos (proteínas y compuestos fenólicos de la miel) pueden inhibir el crecimiento de *E. coli* ATCC y *E. coli* O157:H7, y sus factores de patogenicidad

## Capítulo 6 Materiales y Métodos

### 6.1 Materia prima y microorganismo empleados

La miel de *Melipona beecheii* empleada en éste trabajo se obtuvo del municipio de Maní, del estado de Yucatán. Ésta fue recolectada de manera tradicional, es decir, fue tomada directamente del jobón (tronco hueco), de tal forma que no tuviese ningún tratamiento o proceso que pudieran afectar sus cualidades y propiedades. La miel fue guardada a temperatura ambiente (25-30°C) y en obscuridad hasta su análisis.

Las cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo fueron: *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* O157:H7, las cuales fueron crecidas en medios de cultivo Luria Bertani (LB) agar modificado por Miller el cual contiene 10 % de cloruro de sodio (Atlas, 2010) a 37 °C durante 12 h y almacenadas a 4 °C para las pruebas posteriores.

### 6.2 Determinación de la actividad antibacteriana de la miel de *Melipona beecheii* por el método de difusión en disco.

Para la determinación del potencial antibacteriano de la miel de *Melipona* contra *E. coli* ATCC y *E. coli* O157:H7 se utilizó el método de difusión en disco descrito por Schwalbe *et al* (2007). En ésta prueba las cepas se reactivaron nuevamente con medio de cultivo LB agar y se incubaron a 37 °C durante 12 h, seguido se le realizó un ajuste de inóculo para ambas cepas a 0.5 en escala McFarland, lo cual equivale a  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) y 0.1 en absorbancia. Ambos inóculos se diluyeron a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL para su empleo. El ajuste de los inóculos bacterianos se realizó tomando con un asa de siembra algunas colonias y se diluyeron en un tubo eppendorf 1.5 mL que contenía una solución salina al 0.85 %.

Ya obtenido los inóculos, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de cada uno de éstos y se depositaron en cajas petri que contenía Agar Mueller Hinton y con un hisopo se dispersó homogéneamente en toda la superficie del medio de cultivo que contenía la caja petri, se dejó reposar 15 min y se colocaron discos de papel filtro, en donde se les adicionó 30  $\mu\text{L}$  de miel de *Melipona beecheii* al 100, 80, 40, 20 y 10 %. Se usaron como controles solución salina (30  $\mu\text{L}$ ) y 30  $\mu\text{L}$  de ampicilina a partir de un stock de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y se incubaron a 37 °C durante 24 h.

### **6.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de la Miel de *Melipona beecheii* por el método de micro dilución.**

Para determinar la concentración mínima inhibitoria de la miel se utilizó el método propuesto por Schwalbe *et al* (2007). De cual de igual modo que en la prueba de difusión en disco, se tomaron algunas colonias del cultivo de 12 h de incubación (*E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* O157:H7) y se suspendieron ambas por separado en solución salina 0.85 % para ajustar un inóculo a 0.5 McFarland, pero a diferencia del método de difusión en disco, el inóculo se diluyó a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/mL para su empleo.

Se preparó un stock de miel al 80 % y se utilizaron tubos con rosca de 5 mL, con 1 mL de medio Mueller Hinton (2X). Posteriormente, a cada tubo con Mueller Hinton 2x se le agregó la cantidad correspondiente del stock de miel y agua destilada estéril, para obtener concentraciones de miel del 5 al 40 %, considerando un volumen final de 2 mL. Cada concentración se hizo por triplicado, debido a que la muestra diluida en el medio presentaba turbidez se realizó un blanco para cada concentración evaluada.

Por último, se inoculó los tubos con 20  $\mu\text{L}$  de la solución bacteriana. Se incubo a 37°C a 200 rpm por 24 h y se leyó su absorbancia a 600nm en un biofotómetro eppendorf modelo 6131.

#### **6.4 Extracción de los compuestos fenólicos de la miel de *Melipona becheeii*.**

Para la extracción de los compuestos fenólicos presentes en la miel de *Melipona* se empleó el método propuesto por Ferreres *et al* (1994). Se mezclaron 200 g de miel con 5 partes de agua ácida (pH 2 con HCl), la mezcla fue filtrada para eliminar las partículas sólidas contenidas en la miel a través de algodón previamente tratado con acetona.

Una vez filtrada la miel se pasó por una columna de vidrio (2 cm de diámetro x 30 cm de largo) con 200 g de Amberlita XAD-2, después de lo cual la columna fue lavada con 100 mL de agua ácida (pH 2) y posteriormente con otros 300 mL de agua destilada.

Los compuesto fenólicos retenidos en la columna fueron recuperados con aproximadamente 300 mL de metanol hasta que el disolvente no tuvo color.

Los extractos de metanol obtenidos de la columna, se concentraron a presión reducida en un rotavapor a 40 °C hasta evaporar completamente el metanol, el extracto fue recuperado en 15 mL de agua destilada. Las muestras obtenidas fueron particionadas mediante una extracción liquido-liquido con 15 mL de éter etílico tres veces, recuperando la fase superior en cada ocasión, Después de la extracción, al éter recuperado se le agregó la cantidad necesaria de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro para eliminar el agua restante de las muestras y se dejó sedimentar el exceso por 30 min, después de lo cual se decantó el éter a un recipiente nuevo.

Finalmente el éter etílico se dejó evaporar toda una noche y se recuperaron los compuestos fenólicos en 1 mL de metanol grado HPLC, las muestra fueron almacenadas a una temperatura de -20 °C.

Se empleó otro método de extracción de los compuestos fenólicos de la miel propuesto por Zehra Can *et al.*, 2015, esto para conocer que método es más eficiente. El cual consistió en pesar 15 g de miel y diluirlo en 50 mL de metanol al 99% y agitarlo con un agitador durante 24 h. Pasado ese tiempo los compuestos fenólicos se concentraron en un rotavapor a baja presión a 40°C, hasta evaporar aproximadamente todo el metanol. Finalmente la muestra fue almacenada a 4°C.

### **6.5 Determinación del contenido fenólico del extracto fenólico de la miel de *Melipona beecheii*.**

Para determinar el contenido fenólico del extracto fenólico de la miel de *Melipona* (EF), se utilizó el método de fenoles totales propuesto por Saravana y Mandal (2009) usando el reactivo de Folin-Ciocalteu. El cual consiste en una reacción de los compuestos fenólicos presentes en la miel con el reactivo de Folin-Ciocalteu dando un color azul. Se tomaran 100  $\mu\text{L}$  del extracto y se mezclaron con 500  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10) e incubados a temperatura ambiente por 5 min.

Una vez pasado este tiempo se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (75 g/L) y se dejó incubar la mezcla a temperatura ambiente por 2 h antes de medir su absorbancia a 760 nm. Como patrón se empleó una curva de calibración de Acido Gálico con concentraciones de 0, 80, 160, 320, 400, 560, 640  $\mu\text{g/mL}$ .

### **6.6 Extracción de los compuestos proteicos de la miel de *Melipona becheei*.**

Para la extracción de las proteínas presentes en la miel se empleó el método descrito por Schmitzova *et al* (1998). El cual consistió en diluir 2 g de la miel de *Melipona* por cada 10 mL de buffer de fosfatos (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0; 100 mM NaCl, pH 8.0). La mezcla se incubó en hielo durante 30 min, con intervalos de agitación de 5 min. Posterior a la agitación la mezcla se centrifugó a 5000 g por 50 min para eliminar polen y diversas partículas presentes en la miel. El sobrenadante se concentró mediante ultrafiltración, utilizando filtros amicon de 3 k. El sobrenadante se depositó en los filtros y fue centrifugado a 5000 g por 40 min. Una vez centrifugada la muestra, el concentrado se traspasó a tubos de 1.5 mL y se guardaron a 4 °C hasta su posterior análisis.

### **6.7 Determinación de la concentración Proteica en la miel de *Melipona beecheii*.**

Para determinar el contenido proteico del extracto proteico de la miel de *Melipona beecheii* (EP) se determinó por el método de Bradford, para lo cual se utilizó una curva estándar de BSA (Albumina sérica Bovina) de la marca sigma con concentraciones de 1,2.5, 5, 10, 15, 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Para el caso de las muestras y los stocks se tomaron 10  $\mu\text{L}$  del extracto y diluidas en 90  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, a los cuales se les adiciono 1 mL de la solución de Bradford. Las muestras se incubaron por 5 min a temperatura ambiente en oscuridad, transcurrido ese tiempo finalmente se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm, usando como blanco el buffer de fosfatos (Bradford, 1976). La cuantificación se realizó por triplicado.

### **6.8 Determinación del perfil proteico y peso molecular mediante un sistema SDS-PAGE.**

El perfil proteico de EP se realizó mediante un sistema desnaturalizante (SDS-PAGE) (Bizani et al., 2005). Se utilizaron dos tipos de geles, un gel de separación al 12 % de acrilamida y uno de apilamiento al 4 %, con un buffer de corrida (Glicina-Tris-SDS). Para la preparación de la muestra se tomaron 2  $\mu\text{g}$  de cada extracto, los cuales se diluyeron en 3  $\mu\text{L}$  de buffer de carga (5x) y agua destilada aforando a un volumen de 15  $\mu\text{L}$ , posteriormente las muestras fueron incubadas por 5 min a 95 °C para favorecer a la desnaturalización de las proteínas. (Bollag, 1996). Los geles fueron corridos a 75 V durante 2 h a temperatura ambiente y teñidos con nitrato de plata.

La masa molecular relativa ( $M_r$ ) de los polipéptidos de la miel se identificaron a partir de la movilidad electroforética (RF), los cuales fueron calculados mediante regresión lineal logarítmica del patrón de migración de los polipéptidos de las muestras evaluadas.

### **6.9 Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos fenólicos y proteicos de la miel de *Melipona beecheii* mediante difusión en disco.**

De igual manera que en la determinación de la actividad antibacteriana de miel de *Melipona* se utilizaron las cepas ATCC de *Escherichia coli* 25922 y *Escherichia coli* O157:H7. El inóculo utilizado fue de 0.5 en la escala McFarland, con un hisopo se homogenizó el inóculo bacteriano en toda la superficie de la placa que contenía medio Mueller Hinton. Posteriormente se colocaron discos de papel filtro de la marca millipore, en donde se les adicionó diferentes concentraciones de los extractos a evaluar. Para el caso de EF y EP proteico se evaluaron 80, 100 y 120 µg. Se utilizaron como control negativo metanol para las cajas con el extracto fenólico y para las cajas con el extracto proteico se utilizó como control negativo buffer de fosfatos. Como control positivo se utilizó 30 µL de ampicilina de un stock de 1 µg/µL. Todas las placas se incubaron a 37 °C por 24 h. (Schwalbe *et al* 2007).

### **6.10 Determinación de Concentración mínima inhibitoria de los extractos fenólicos y proteicos de la miel de *Melipona*.**

En esta parte del estudio, se evaluaron concentraciones de 10 hasta 300 µg/mL de EF y EP. Para la realización de esta prueba se utilizaron tubos de 2.5 mL, con 250 µL de medio Mueller Hinton (2X). Posteriormente, a cada tubo con medio Mueller Hinton 2X se le agregó el extracto a evaluar cuya cantidad adicionada dependió de la concentración final deseada teniendo en cuenta que el volumen final en cada tubo fue de 500 µL. Cada concentración se realizó por triplicado. Por último, se inoculó con 50 µL de la solución bacteriana 0.5 McFarland y fueron incubadas a 37 °C durante 24 h (Schwalbe *et al* 2007).

### **6.11 Cinética de letalidad de *E.coli* O157:H7 en presencia de la miel de *Melipona beecheii* y de sus extractos proteico y fenólico.**

Para evaluar el efecto inhibitor de la miel y de sus extractos contra *E. coli* O157:H7 se construyó una curva de crecimiento en medio Mueller Hinton. Una vez obtenida la curva de crecimiento se realizaron cinéticas de letalidad siguiendo el método descrito por Schneider *et al.*, 2010. El inóculo bacteriano se ajustó con una solución de NaCl (0.85%) a 0.5 en escala McFarland se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. En tubos eppendorf de 1.5 mL con medio Mueller Hinton se agregaron 25 µL del inóculo y se realizaron mezclas a las concentraciones correspondientes 1X y 2X de CMI de la miel, EP, EF y ampicilina, en un volumen final de 500 µL. Las mezclas se incubaron a 37 °C, en agitación (200 rpm) y se tomaron muestras cada hora las cuales fueron leídas a 600 nm durante un tiempo total de 6 h. Cada muestra fue cultivada en medio LB-agar y las UFC/mL se contaron después de 24 h de incubación a 37°C.

### **6.12 Evaluación de la actividad hemolítica en presencia de la miel de *Melipona beecheii* y los extractos proteicos y fenólicos.**

La actividad hemolítica de *E. coli* O157:H7 en presencia de la miel, EF y EP se realizó utilizando el método descrito por Seong-Cheol *et al* 2010 a través de glóbulos rojos de un humano sano. Se mezclaron suavemente 4.5 mL de sangre con 0.5 mL de citrato de sodio al 38 % para evitar la coagulación de la sangre, la mezcla se centrifugó a 800 g durante 15 min, posteriormente se retiró el sobrenadante, esto para eliminar el plasma sanguíneo, leucocitos y trombocitos, obteniendo un paquete celular de eritrocitos (glóbulos rojos). El paquete celular obtenido fue lavado tres veces con 1 mL de buffer de fosfatos de sodio 0.05 M (pH 7.4) con 0.9 % de NaCl, centrifugando en cada ocasión por 5 min a 800 g. Después de los lavados se preparó una suspensión de glóbulos rojos al 0.5 % (SGR) con el mismo buffer de fosfatos. Se tomaron 900 µL

de SGR, 100 µL de buffer de fosfatos de sodio, se agregó miel al 2X CMI cuya cantidad adicionada dependió de la concentración final deseada teniendo en cuenta que el volumen final en cada tubo fue de 1 mL y se inoculó con 50 µL de la solución de *E. coli* O157:H7 de 0.5 McFarland, la cual fue crecida previamente en un medio de cultivo de agar sangre, para activar su estado de virulencia. De igual manera que con la miel, se realizó lo mismo pero con EF y EP utilizando 2X su CMI de cada uno de éstos.

Todas las muestras se incubaron con agitación durante 60 min a 37 °C, y después se centrifugaron durante 10 min a 800 g. La absorbancia de los sobrenadantes se evaluó luego a 414 nm. Además, se evaluaron los controles de cero hemólisis (en blanco), el 100% de hemólisis y *E. coli* ATCC 25922 como control negativo. Todas las muestras se llevaron a cabo por triplicado.

El porcentaje de hemólisis fue calculado utilizando la siguiente ecuación (Park, 1998).

$$\% \text{ de Hemolisis} = \frac{\text{abs muestra} - \text{abs blanco}}{\text{abs O157:H7}} \times 100$$

### 6.13 Visualización por microscopia electrónica de barrido

Las muestras sometidas a la actividad hemolítica fueron visualizados por medio de un microscopio electrónico de barrido (SEM) siguiendo el protocolo de Aaron Polliack *et al* (1980). Las muestras se centrifugaron a 800 g durante 5 min, la pastilla de células resultantes de la centrifugación fueron fijadas con glutaraldehído al 3 % durante toda la noche. Posteriormente las células fueron lavadas brevemente con cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.2, se deshidrataron en una serie graduada de etanol de 50 al 100 % y se suspendieron en 500 µL de agua bi-distilada. A partir de entonces se recogieron las células en un cubreobjetos y se secaron a punto crítico con freón 13 (Quorum

modelo K850). Los cubreobjetos fueron sometidos a pulverización catódica recubierto con una fina capa de oro-paladio durante 45 s (Quorum modelo Q150r ES) y pegadas en talos de aluminio con cinta adhesiva de plata de doble cara para que posteriormente sean puestas y visualizadas en SEM (Marca Philips, modelo XL30 ESEM, equipado con una Microsonda Dispersiva en energía marca EDAX).

#### 6.14 Diseño de primers.

Se diseñaron oligos de ADN de la bacteria O157:H7 de acuerdo a la base de datos del GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)), para el análisis de PCR y RT-PCR. En la Tabla 6.1 muestra los genes housekeeping y virulencia diseñados para PCR y RT-PCR con sus respectivos productos que generan en su transcripción, así como los tamaños de bases esperados.

**Tabla 6. 1** Genes housekeeping y de virulencia de *E. coli* O157:H7.

Gene	Producto	Tamaño pb (PCR)	Tamaño pb (RT-PCR)
<b>ECid</b>	Isocitrato deshidrogenasa	503	100
<b>ECsfs</b>	Factor sigma	532	100
<b>ECmd</b>	Malato deshidrogenasa	519	100

<b>ECmp</b>	mannitol-1-fosfato deshidrogenasa	604	100
<b>ECpgi</b>	Glucosa-6-fosfato isomera	630	100
*Stx2 A	Toxina Shiga 2 de la subunidad A	529	100
*Stx1 A	Toxina Shiga 1 de la subunidad A	543	100
*EAE	Intimina (proteína de adherencia)	796	100
*HlyE	Hemolisina	501	100

(Con negrillas están marcados los genes housekeeping y con asterisco\* los genes de virulencia)

### 6.15 Extracción del ADN genómico de *E. coli* O157:H7.

Para extraer el ADN genómico de *E. coli* O157:H7 se incubó en LB a 37°C y se siguió un protocolo de extracción el cual consistió en tomar una asada bacteriológica y se homogenizó en 400 µL de solución salina. Posteriormente se le adicionó 30 µL de solución SDS al 10 % y 3 µL de proteinasa K, se mezcló e incubó durante una hora a 37 °C. Terminado el tiempo de incubación se le añadió 100 µL de NaCl 5 M y 80 µL de CTAB (2 % de β-mercaptoetanol), se mezcló e incubó a 65 °C durante 10 min.

Posteriormente se le adicionó un volumen de la solución fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (15/24/1). Se centrifugó por 5 min a 12000 rpm durante 10 min. De las fases resultantes de separación se tomó el sobrenadante y se colocó en tubos eppendorf estériles. A cada tubo se le agregó 500  $\mu$ L de cloroformo, se mezclaron y se centrifugaron a 12000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se colocaron de nuevo en tubos eppendorf estériles. Estos dos últimos pasos se repitieron de nuevo una vez más. Luego se hizo precipitar con 800  $\mu$ L de etanol toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y se le agregó 400  $\mu$ L de etanol absoluto al pellet.

Finalmente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y se dejaron secar los tubos invertidos a temperatura ambiente (25-30°C), para ser suspendidos en 30  $\mu$ L de agua inyectable pisa. Se conservó a -20°C para su posterior análisis.

#### **6.16 Detección de presencia de los genes Housekeeping y de Virulencia de *E.coli* O157:H7.**

Para la detección de los genes housekeeping y de virulencia se realizó mediante una PCR en gradiente. En la Tabla 6.2 se describen las condiciones de la PCR gradiente. A cada tubo para cada gen se le adicionaron 7 $\mu$ L de agua inyectable pisa, 1 $\mu$ L del oligo *Forward*, 1  $\mu$ L oligo *Reverse* (los oligos utilizados fueron los diseñados para la PCR punto final), 70  $\mu$ L master mix y 1  $\mu$ L de ADN molde. Los productos de la PCR fueron visualizados mediante un gel de agarosa al 0.8%, corridos a 80 Volts durante 40 min.

**Tabla 6. 2** Gradiente de temperaturas para PCR.

Temperatura	Tiempo	Numero de Ciclos
98	1 min	1
98	30 s	30
45-65	1 min	
72	10 min	1

### **6.17 Extracción de ARN bacteriano para la detección de la expresión de los genes de virulencia y housekeeping**

Se realizaron extracciones del ARN de *E. coli* O157:H7 crecido en dos medios de cultivo suplementado diferentemente, esto se realizó para conocer el medio de cultivo ideal para la expresión de todos los genes de virulencia. Los medios de cultivo fueron: Brucella suplementado con 10 % de suero fetal bovino (B+S) y Brucella con 0.1 % de una suspensión de glóbulos rojos (B+G). Éstos se incubaron a 37 °C en agitación reducida por 24 h. La extracción del ARN se llevó acabo usando el método propuesto por Massé *et al.*, 2003. El cual consistió en tomar 750 µL de un cultivo de bacterias con 12 h de incubación y se colocaron en un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL y se centrifugó a 12000 g durante 10 min. Se decantó y se agregaron microperlas de cristal estériles (hasta llegar a la marca de 0.1 mL del tubo). Posteriormente se añadieron 400 µL de la solución de lisis (Acetato de sodio 320 mM a pH 4.6, SDS al 8% y EDTA a 16 mM) y se agitó hasta obtener una mezcla homogénea, ésta mezcla se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante en un tubo estéril al cual se adicionó 400 µL de trizol, se agitó durante 1min, se incubó a temperatura ambiente (25-30 °C) durante 5 min y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min.

Luego el sobrenadante fue transferido en un tubo estéril, el cual fue mezclado con 200 µL de cloroformo, se agitó y se incubó a temperatura ambiente (25-30 °C) durante 10 min. Una vez transferido el tiempo se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min. El

sobrenadante se retiró, se mezcló con 200  $\mu$ L fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) en un tubo estéril y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min.

El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril con 800  $\mu$ L de etanol absoluto a -20 °C, se dejó precipitar durante toda la noche a -20 °C. Una vez precipitado se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 min a 4 °C. Seguido se decantó nuevamente y se le añadieron 500  $\mu$ L de etanol absoluto a -20 °C. Finalmente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min, se decantó, se dejó secar y se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua inyectable pisa.

### **6.18 Síntesis de la primera cadena de ADN (cDNA) para la detección de la expresión de los genes de virulencia y housekeeping.**

En un tubo eppendorf de 1.5 mL libre de ARNasa se añadieron para cada gen 2  $\mu$ L de ARN extraído anteriormente y se agregó 1  $\mu$ L del oligo *Forward* y 1  $\mu$ L del oligo *Reverse* (Los oligos que se usaron fueron los diseñados para RT-PCR), seguido por 8  $\mu$ L de agua libre de ARNasa; posteriormente se añadieron 4  $\mu$ L de buffer de reacción, seguido por 1  $\mu$ L de la enzima RiboLock, 2  $\mu$ L de Dntp's y 1  $\mu$ L de la enzima Revert Aid RT, se incubó en baño maría a 42°C durante una hora; posteriormente para desactivar la enzima se incubó en un termoblock a 70 °C durante 5 min, posterior se dejó enfriar en hielo.

Para la visualización de la expresión de los genes housekeeping y de virulencia se realizó mediante un PCR en gradiente de temperatura que fue de 58, 60 y 62°C utilizando adn molde el cDNA y para cada tubo de cada gen se realizó como en la sección 5.16 pero usando los oligos diseñados para qRT-PCR y finalmente los productos de la PCR fueron visualizados mediante un gel de agarosa al 0.8%, corridos a 80 Volts durante 40 min.

### **6.19 Extracción de ARN para la evaluación de los niveles de expresión de los genes de virulencia de *E. coli* O157:H7.**

Para determinar los niveles de expresión de los genes de virulencia de *E. coli* O157:H7, fue crecido usando 1/2X, 3/4X y 6/7X CMI de miel, EF y EP (concentraciones subletales), en medio de Brucella suplementado con 10 % de suero fetal bovino, durante 12 h de incubación (120 RPM a 37°C). Posteriormente se realizó la extracción del ARN total utilizando el protocolo *Tri Reagent* de la marca Sigma. El cual consistió en aislar las células en suspensión por centrifugación (12,000 g por 5 min), a continuación las células se lisaron con el reactivo *Tri Reagent* mediante pipeteo repetido (1 mL del reactivo por  $1 \times 10^7$  células bacterianas), se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente, seguido se le añadió 0.2 mL de cloroformo, se agitó durante 15 s y se dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente. Pasado éste tiempo se centrifugó a 12,000 g durante 15 min a 2°C y se formaron tres fases, la cual se tomó la fase acuosa superior incolora (ésta fase contiene el ARN). Se le añadió 0.5 mL de 2-propanol, se homogenizó, se dejó reposar durante 10 min y se centrifugó nuevamente a 12,000 g durante 10 min a 2°C (el precipitado de ARN se forma en la parte inferior del tubo). Seguido se decantó y se lavó con 1 mL de etanol al 75 %, se centrifugó a 7,500 g durante 5 min a 2°C. Finalmente se decantó y se dejó secar el sedimento de ARN al aire libre, una vez seco se le añadió 20 µL de agua inyectable pisa y el ARN fue cuantificado por medio de un equipo NanoDrop.

Una vez cuantificado el ARN se realizó la síntesis de la primera cadena (ADNc) utilizando el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR y utilizando como cebadores las colas poli A.

## 6.20 Niveles de transcripción de los genes de virulencia de *E. coli* O157:H7 por qRT-PCR.

Los niveles relativos de transcripción de los genes de virulencia (Stx1A, Stx2A, EAE, Hlye) a los genes de referencia (*housekeeping*: *ecid* y *ecgpi*) se midieron a través de qRT-PCR usando el equipo de StepOne™ de 48 pozos. Se utilizó el cDNA obtenido en el apartado 5.19 y el Syber Green master mix (Como detector). Las condiciones en el equipo fueron: 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 s (desnaturalización), 60°C durante 1 min (alineamiento) y 72 °C durante 30 s (extensión). Seguido de una curva de fusión, para verificar que el producto amplificado corresponda a una sola amplificación de acuerdo a la temperatura de fusión específica (T<sub>m</sub>). El análisis de la curva de fusión consistió en una etapa de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, se redujo a 60 ° C durante 1 min, seguido de 40 ciclos de incubación en los que la temperatura se incrementa a 95 ° C durante 15 s y se obtuvieron valores de C<sub>T</sub>. Cada muestra se probó con cuatro repeticiones y los niveles de transcripción relativa de estos genes de virulencia se calcularon usando el método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

## Capítulo 7 Resultados y discusión.

### 7.1 Cuantificación de los extractos de la miel de *Melipona beecheii*.

El extracto proteico (EP) de la miel de *Melipona beecheii* se obtuvo a una concentración de 2.7 µg de proteína/µL extracto, equivalente a 101.25 mg de proteína/100g de miel. El extracto proteico obtenido de la miel de *Melipona beecheii* proveniente del municipio de Maní, Yucatán, en relación a otras mieles de esta misma especie presenta poca variabilidad, aun cuando son de diferentes regiones y de diferentes fuentes botánicas. Ramón (2012) obtuvo una concentración de proteína de la miel de *Melipona beecheii* proveniente del estado de Campeche con 3.0 µg/µL y 3.19 µg/µL de proteína total de la miel del estado de Chiapas. Aunque se sabe relativamente poco sobre el contenido proteico de la miel de *Melipona beecheii* algunos autores como Lurlina y Fritz (2005) refieren que el contenido de proteína de la miel de *Melipona* es generalmente alrededor de 0.3%, Chua *et al* (2013) indican que el contenido presente en la miel se encuentran en cantidades mínimas de aproximadamente 0.1 a 0.5 %, De Almeida-Muradian *et al* (2013) obtuvieron 0.28 y 0.01% de proteína de la miel de *Melipona subnitida* provenientes de dos regiones diferentes de Brasil. Lo que podría indicar que el método de cuantificación y extracción fueron correctos, ya que la cantidad proteica en la miel del género *Melipona* es muy bajo.

**Tabla 7. 1** Cuantificación de los extractos fenólicos de la miel de *Melipona beecheii*.

Referencia	$\mu\text{g EAG}/\mu\text{L extracto}$	$\text{mg EAG}/100 \text{ g de miel}$
Ferreres <i>et al.</i> , 1994	133	66.6
Zehra Can <i>et al.</i> , 2015	5.1	34

Para el caso del contenido fenólico de la miel de *Melipona*. Se utilizaron dos métodos diferentes de extracción. El método propuesto por Ferreres *et al.*, 1994 se obtuvo un extracto con concentración de 133  $\mu\text{g EAG}/\mu\text{L}$  de extracto, mientras que el método propuesto por Zehra Can *et al.*, 2015 tuvo una concentración de 5.1  $\mu\text{g EAG}/\mu\text{L}$  extracto. Esta baja concentración se debe a que en este último método propuesto se utiliza menos miel, pero si lo comparamos estos dos métodos propuesto por cada 100 g de miel, como se observa en la Tabla 7.1 resultó el método propuesto de Ferreres el más eficiente, ya que se obtiene un rendimiento de 1.95 veces más de compuestos fenólicos. Por otro lado comparando éstos extractos fenólicos obtenidos en este trabajo con los extractos de origen fenólico de mieles provenientes de diferentes países y de diferentes especies de abejas sin aguijón tal como *Melipona compressipes compressipes*, *Melipona favosa favosa*, *Melipona merrillae seminigra*, incluyendo a la *Melipona beecheii* se encuentran en el rango, ya que reportan concentraciones de 17 a 100 mg EAG/100 g de miel. No solo hay variación en las mieles de la especie *Melipona*, sino también en mieles de abeja con aguijón (*Apis mellifera*) provenientes de regiones geográficas diferentes como se observa en la Tabla 7.2 según Almeida-Da Silva *et al.*, 2013 afirma que estas variaciones en la concentración de los compuestos fenólicos en la miel se deben al tipo de fuentes botánicas, ya que, gran parte de este contenido proviene del polen de las flores.

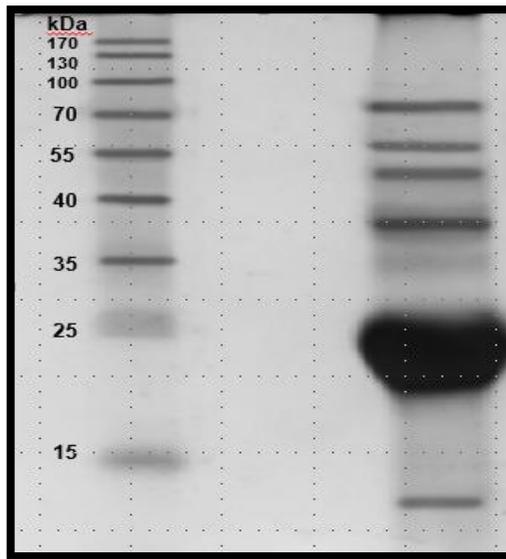
**Tabla 7. 2** Concentración de compuestos fenólicos totales en miel de distintos orígenes.

<b>País</b>	<b>Miel</b>	<b>mg EAG/100g de miel</b>	<b>Referencia</b>
<b>Argentina</b>	<i>Tetragonisca angustula fiebrigi</i>	41.8 - 44	Vattuone <i>et al.</i> , 2007
	<i>Plebeia wittmanni</i>	28.3- 32.1	
<b>Italia</b>	<i>Apis mellifera</i>	15.13 – 82.49	Giorgi <i>et al.</i> , 2011
<b>Brasil</b>	<i>Melipona subnitida</i>	40	De Sousa <i>et al</i> 2012
	<i>Melipona seminigra merrillae</i>	17-66	da Silva <i>et al.</i> , 2013
<b>Venezuela</b>	<i>Melipona compressipes compressipes</i>	100	Vit <i>et al.</i> , 1997
	<i>Melipona favosa favosa</i>	28.2- 79.5	

<b>México</b>	<i>Apis mellifera</i>	94.6	Martínez, 2012
	<i>Melipona beecheii</i>	51.53	

### 7.2 Determinación del perfil proteico de la miel de *Melipona beecheii*.

El perfil proteico de la miel de *Melipona beecheii* mostró 7 bandas definidas de diferentes pesos moleculares aproximadamente de 95, 55.4, 49.7, 25.3, 14.6, 11.6 y 7.6 kDa respectivamente como se observa en la Figura 7.1, indicando que el método de extracción usado fue el adecuado, además éste resultado concuerda con lo reportado por Ramón (2012), donde reporta 7 bandas nítidas en la miel de *Melipona beecheii*.



**Figura 7. 1** Perfil proteico de miel de *Melipona beecheii* en un gel desnaturizante al 12% de poliacrilamida.

En el perfil proteico se pueden observar bandas de bajo peso molecular, lo que podría tratarse de péptidos antimicrobianos, ya que hay estudios realizados como por ejemplo: Kamakura (2001) reportan péptidos de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana; Hancock (2007) reportan péptidos aislados del aparato digestivo de la abeja presentan actividad antimicrobiana y Kwakman (2010) reportó la presencia de una defensina-1, un péptido de un peso molecular de 5 kDa con actividad antimicrobiana contra gram positivas aislada de una miel medicinal.

Otros autores como Valachova *et al* (2016) reportaron que la actividad antimicrobiana de diferentes miles líquidas y cristalizadas de fuentes monoflorales y poliflorales mostró una correlación dependiente de la concentración con la producción de defensina-1. Por otro lado Brudzynski y Sjaarda (2015) reportaron un perfil electroforético de fracciones aisladas de glicoproteínas por cromatografía de afinidad e identificaron bandas de 61 y 29 kDa, siendo ésta última la más abundante. La primera banda tuvo una correlación de identidad con la proteína Major Royal Jelly Protein 1 (MRJP1) proveniente de la Jalea Real de *Apis mellifera* y la segunda banda era un fragmento de la MRJP1. La Actividad antibacteriana de las glicoproteínas se correlacionó directamente con la actividad de la miel.

En éste estudio las bandas de 7.6, 25.3 y 55.4 kDa, posiblemente sean proteínas y/o péptidos a lo reportado con actividad antimicrobiana, ya que otros autores reportan que el contenido proteico se encuentra estrechamente relacionado con la actividad antibacteriana de la miel de *Melipona beecheii*.

### **7.3 Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco.**

En la determinación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco, en la Figura 7.2 se observó halos de inhibición con bordes nítidos, el cual nos mostró

el efecto antibacteriano de la miel de abeja *Melipona beecheii* frente a *E. coli* ATCC 25922 en un periodo de incubación de 24 h. También se observó que a mayor porcentaje de miel se obtenía un mayor efecto antimicrobiano, debido a que los halos aumentaron conforme al aumentar el porcentaje de miel. El extracto proteico (EP) también mostró halos de inhibición con bordes nítidos, a diferencia que estos fueron uniformes frente a *E. coli* ATCC 25922 en 24 h de incubación. Esto posiblemente se deba a que en EP, las proteínas presentes en la miel se encuentran en mayor concentración, como se puede observar en la Figura 7.2 que con pocos microgramos de este extracto fueron suficientes para inhibir el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922.

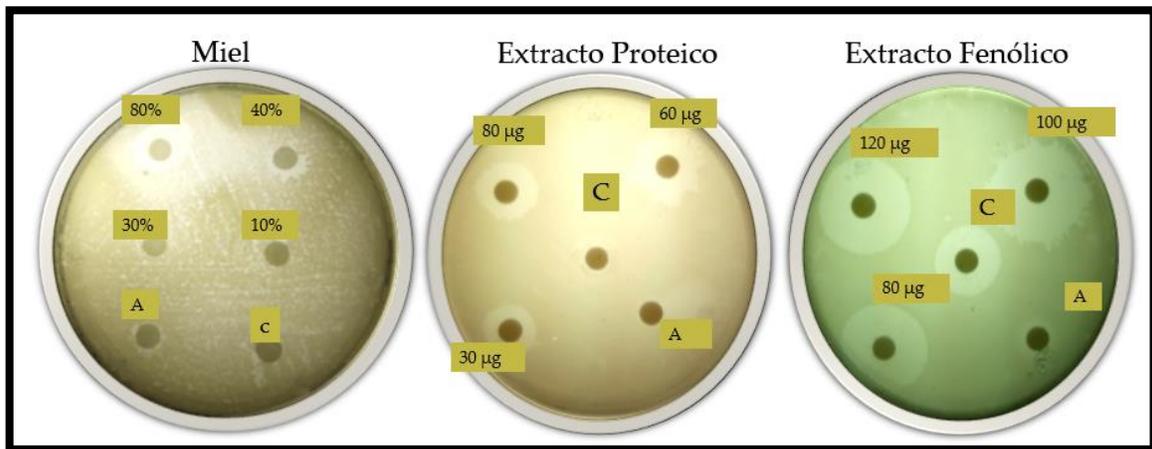
Para el caso del extracto fenólicos extraído con el método propuesto por Zehra Can, éste no presentó tener actividad antimicrobiana contra la cepa *E. coli* O157:H7 (Anexo 1), por lo que se descartó éste extracto fenólico para seguir con la investigación y el otro extracto fenólico extraído por el método de Ferreres (EF) como se observa en la Figura 7.2 mostró halos nítidos y uniformes frente a *E. coli* ATCC 25922 en un periodo de incubación de 24 h, por lo que se optó en utilizar éste extracto fenólico para los estudios posteriores.

EL extracto fenólico (EF) al igual que el extracto proteico (EP) no presentaron halos mayores de inhibición al aumentar las cantidades del extracto fenólico, indicando que las cantidades evaluadas al aumentarlas son independientes al halo de inhibición que presentan, pero el halo de 80 µg del extracto fenólico fue mayor en comparación con el halo de 80 µg del extracto proteico, indicando que el extracto fenólico posee otro u otros compuestos bioactivos diferente al extracto proteico.

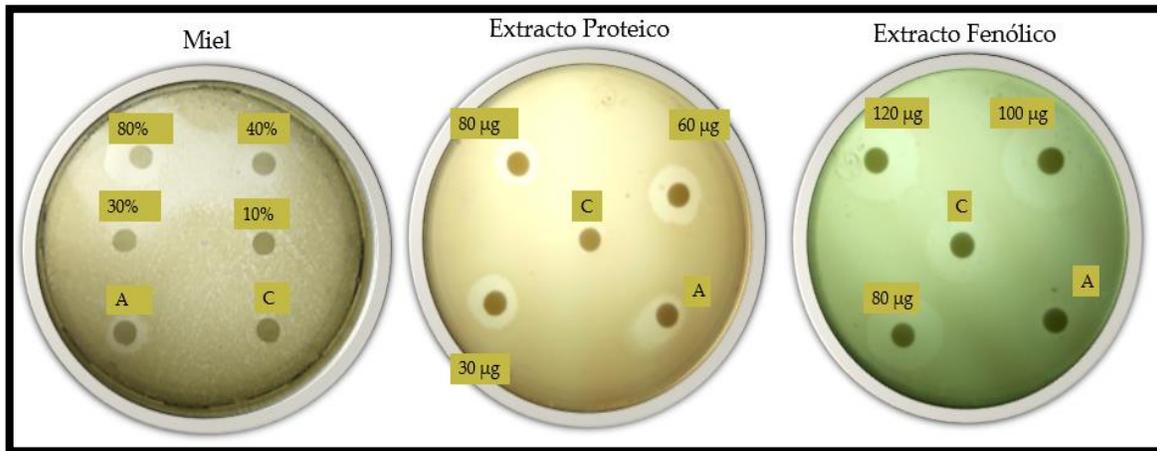
La miel y ambos extractos mostraron tener mayor actividad antimicrobiana en comparación con la ampicilina (A), debido a que se observó un menor halo de inhibición. Se utilizó como controles negativos (C) agua en la caja de miel; buffer de fosfatos en la caja del extracto proteico; metanol en la caja del extracto proteico. Se usaron estos controles debido a que cada uno de éstos estaba suspendido en esos solventes, siendo el control metanol el que único que mostró inhibir el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922, debido a que este es toxico para las células. A las 48 h de

incubación en el halo de metanol se observó crecimiento de colonias de *E. coli*, diferencia que no presentó los halos del extracto fenólico. Indicando que son los compuestos fenólicos los responsables de la actividad antimicrobiana y no el metanol.

Existen pocos reportes donde se evalúa la actividad antimicrobiana de la miel de *Melipona becheii* contra de *E. coli* ATCC 25922. Chan-Rodríguez (2012) reportó que con 80% de miel inhibió el crecimiento de esta misma bacteria. Temaru *et al* (2007) reporta que ésta miel presenta actividad antimicrobiana contra *E. coli* ATCC 25922. También existen reportes de inhibición contra esta cepa con distintas mieles procedentes de distinta flora pero son producidas por *Apis mellifera*, como los datos obtenidos por Cooper *et al.*, (1999). Schneider *et al* (2013) informó la actividad antimicrobiana de una miel de Escocia, llamado miel de Portobello. Miel producida por la abeja *Apis mellifera* en un huerto de manzanas en Portobello, Edimburgo, Escocia. Ésta miel de Escocia presento tener actividad contra *E. coli* en concentraciones de 50 a 70 % de miel. Carnwath *et al* (2014) reportó las actividades antimicrobianas de miles de grado médico y mieles de Manuka en concentraciones de 2 al 16 % contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.



**Figura 7. 2** Actividad antimicrobiana contra *E. coli* ATCC 25922. A (ampicilina 30 µg) C (control negativo).



**Figura 7. 3** Actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7. A (ampicilina) C (control negativo).

De igual manera se evaluó la actividad antimicrobiana contra la *E. coli* O157:H7, la cual la miel de *Melipona becheii* así como los extractos proteicos y fenólicos mostraron halos de inhibición nítidos y definidos a las 24 h de incubación contra ésta cepa enterohemorrágica, mostrando de igual manera su efecto antimicrobiano como se observa en la Figura 7.3. La miel de *Melipona* contra la cepa enterohemorrágica al igual que la ATCC al aumentar el porcentaje de miel se observaron halos mayores de inhibición de crecimiento, pero siendo más nítidos y un poco más grandes los de la O157:H7. Para el caso de los extractos proteico y fenólico contra *E. coli* O157:H7 su efecto de los halos de inhibición fue semejante a los de *E. coli* ATCC 25922 a diferencia con 80 µg del extracto proteico el que mostró un halo menor de inhibición contra la cepa enterohemorrágica.

También se puede observar en la Figura 7.3 los halos de inhibición de ampicilina contra la *E. coli* O157:H7 son mayores en comparación a la ATCC. Esta variación posiblemente sea debido a que el serotipo O157:H7 ha adquirido genes de virulencia y este cambio haya alterado algún mecanismo de defensa dejándola un poco más vulnerable a ciertos ataques de agentes antimicrobianos. Los controles negativos son

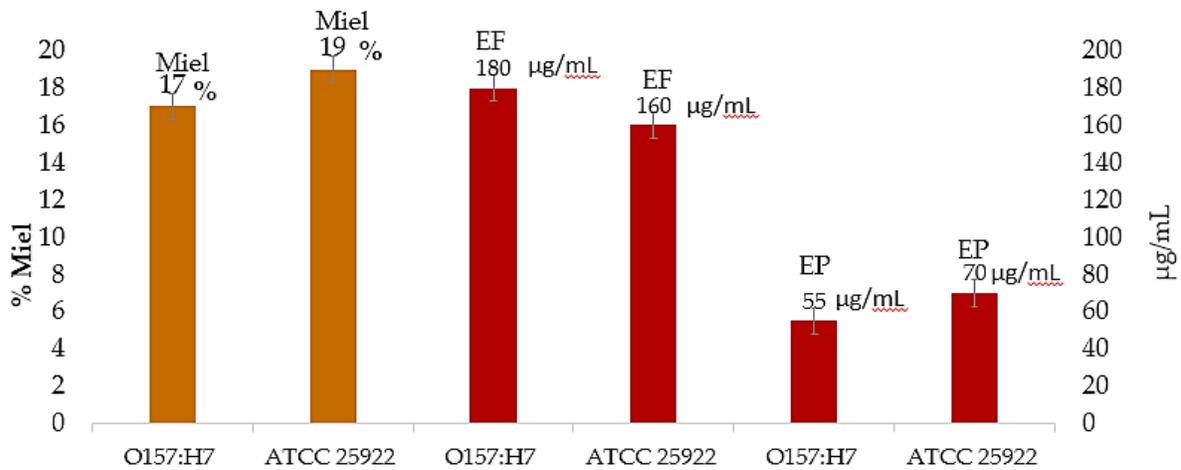
los mismos al igual con la actividad antimicrobiana de la *E. coli* ATCC. Hasta la fecha no hay trabajos que indiquen el efecto antimicrobiano de la miel de *Melipona beecheii* contra la *E. coli* O157:H7, pero hay trabajos donde reportan otros tipos de mieles que presentan actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7 como por ejemplo: Zamora *et al* (2011) reportó una miel de Melipona (no especifica la especie) tanto pura como diluida presentó actividad frente a éste serotipo de *E. coli*; Badawy *et al.*, 2004 reportaron halos de inhibición de crecimiento con 5, 10 y 20 % de miel de trébol en Egipto contra *E. coli* O157:H7 y Taormina (2001) reportó una miel monofloral que posee actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7.

Para los extractos proteicos y fenólicos se han comprobado que estos si presentan actividad antimicrobiana contra *E. coli* ATCC 25922. Ramón (2012) y Martínez (2012) respectivamente reportaron que los extractos poseen actividad contra esta cepa de colección. Pero no hay reportes que demuestran que estos extractos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7. Debido a que no hay trabajos que reporten la actividad antimicrobiana de la miel de *Melipona beecheii* así como sus extractos proteicos y fenólicos contra el serotipo O157:H7, siendo este el primer trabajo en reportar que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de la cepa hemorrágica de *E.coli*.

#### **7.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la miel de *Melipona beecheii* y de los extractos proteicos y fenólicos contra *E. coli* O157:H7 y *E. coli* ATCC 25922.**

Fue posible determinar la CMI, siendo esta la cantidad necesaria para inhibir el crecimiento de estas dos cepas de *E. coli*. En la Figura 7.4 podemos observar que con solo el 17% de miel se logró inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7, pero para inhibir a *E. coli* ATCC se requirió de más porcentaje con un 19%. Este efecto se repitió con el extracto proteico ya que para inhibir el crecimiento de la O157:H7 se requirió menos

cantidad del extracto proteico con 55  $\mu\text{g}$  comparada con la ATCC el cual requirió 70  $\mu\text{g}$  para inhibir el crecimiento de la ATCC. Efecto contrario sucedió con el extracto fenólico, necesitando 180  $\mu\text{g}$  para inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en comparación con la ATCC 25922 que requirió sólo 160  $\mu\text{g}$  del extracto fenólico. Estas variaciones entre los extractos posiblemente se deban a que cada uno posee diferente tipo de mecanismo de acción, siendo más susceptibles ambas cepas al extracto proteico de la miel, debido a que se requirió de una menor concentración para inhibir su crecimiento.



**Figura 7. 4** Concentraciones mínimas inhibitorias de la miel, extracto proteico y fenólico para la *E. coli* O157:H7 y *E. coli* ATCC 25922.

Es notable observar el bajo porcentaje de miel que se requiere para inhibir los crecimientos de las bacterias. Comparando estos resultados con otros trabajos observamos que hay variaciones en la CMI de miel contra otros trabajos reportados como por ejemplo: Dardón y Enríquez (2008) reportaron la CMI de miel *Melipona beecheii* fue de 5% contra *E. coli*; Chan (2012) reportó el mismo porcentaje de miel para CMI de miel contra *E. coli* H12K06 de un aislado clínico y 15% de miel para *E. coli* ATCC 25922 siendo esta última muy similar al CMI reportado en este trabajo. De

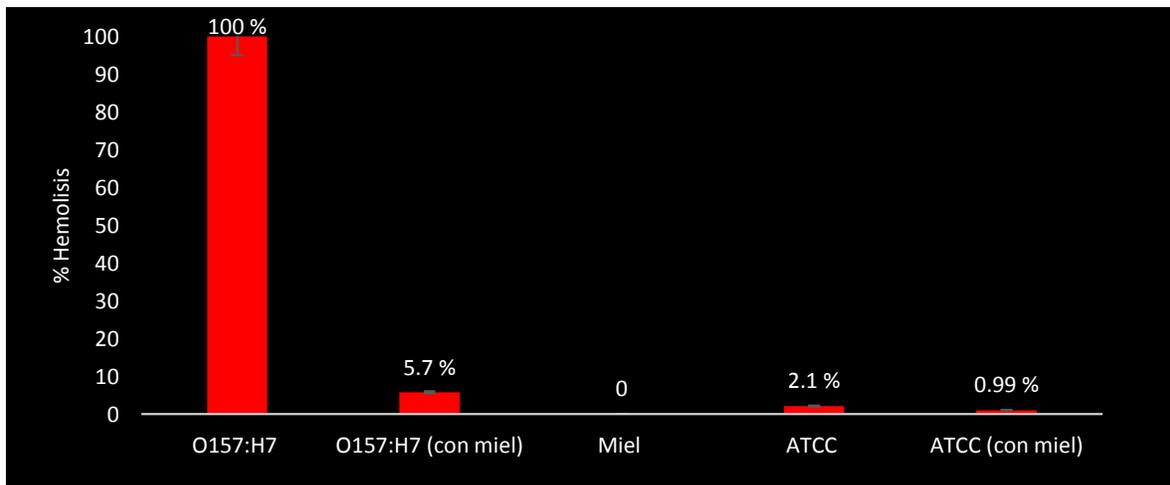
igual manera existen diversos trabajos donde reportaron la CMI de otras mieles de diferente especies de abeja y de diferentes países y se pudo apreciar que existen variaciones en la CMI. Por ejemplo Anduaem en el 2013 reportó 12.5% CMI de miel de abeja *Apis mellipodae*, una abeja sin aguijón contra *E. coli* ATCC 25922 y de igual manera esta miel inhibió otras bacterias Gram-negativas; en otro estudio Pimentel *et al.*, 2013 recolectaron 18 muestras de miel de abeja sin aguijón *Melipona compressipes manaosensis* en Manaus, Amazonas y Brasil, las cuales presentaron tener actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus*, *Proteus vulgaris* y *Klebsiella*, y se demostró que la miel recogida durante la temporada de lluvias inhibió el crecimiento de *E. coli* sólo en forma pura (no diluida), mientras que la miel en el periodo de sequía inhibió el crecimiento de *E. coli*, *S. aureus* y otra gama de microorganismos a concentraciones mucho más diluidas. Estos resultados muestran claramente la influencia de la estacionalidad sobre la actividad antibacteriana que pueda presentar la miel. Factores derivados de las plantas o factores entomológicos como la salud de las colonias de abejas puede también verse afectada por las estaciones, con consecuencias a la actividad antimicrobiana de la miel producida (McLoone *et al.*, 2015). Y es por ello a que hubo variación en la CMI obtenida en este trabajo comparado con otros autores.

Con respecto a las CMI's de los extractos, Ramón (2012) reportó 54µg de proteína de miel de *Melipona beecheii* para *E.coli* ATCC 25922 y Martínez (2012) reportó 100 µg de extracto fenólico de miel para como CMI para esta misma cepa ATCC.

Para el caso de *E. coli* O157:H7 existen CMI de otras mieles contra este serotipo. Por ejemplo: Badawy *et al* (2004) reportó la CMI de la miel de *Egyptian clover* fue de 100 mg/mL; Abd El Moez *et al* (2013) reportó la CMI de una miel de flor de algodón en Egipto fue de 3.125 µg/mL. Hoy en día no existen reportes de las concentraciones mínimas inhibitorias de la miel de *Melipona beecheii*, así como de los extractos proteicos y fenólicos contra *E. coli* O157:H7, siendo este el primer trabajo en reportarlo.

### 7.5 Evaluación de la actividad hemolítica de *E. coli* O157:H7 en presencia de la miel, extracto proteico y fenólico.

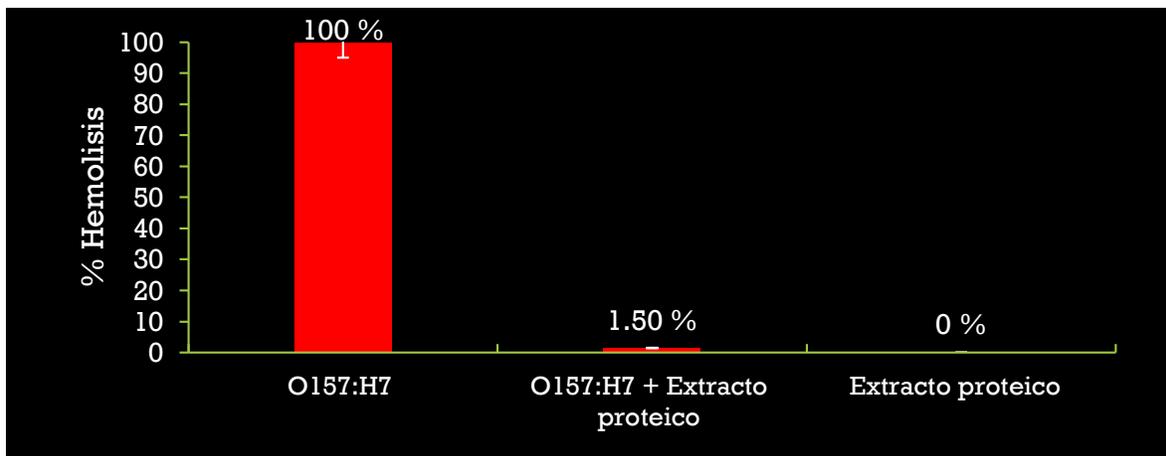
Al evaluar la actividad hemolítica de la *E. coli* O157:H7 en presencia de miel de *Melipona beecheii*, ésta mostró disminuir en un 94.3 % la actividad hemolítica de *E. coli* O157:H7 como se muestra en la Figura 7.5 la reducción de dicha actividad por parte de la miel de Melipona, le otorga un plus a este alimento, debido a que este producto de la colmena no sólo posee la capacidad de inhibir el crecimiento de este peligroso patógeno sino que además puede reducir la capacidad de lisar a los eritrocitos de manera que la miel o algún compuesto de la miel interfiere con uno de los mecanismos de patogenicidad de esta bacteria, inhibiendo la acción de la hemolisina.



**Figura 7. 5** Actividad hemolítica de *E. coli* O157:H7 y *E. coli* ATCC 25922 en presencia de miel de *Melipona beecheii*.

Por otro lado al medir la actividad hemolítica de la miel únicamente, esta última no presentó actividad alguna, garantizando que la miel es inocua, lo cual es un requisito

para ser considerada como un tratamiento alternativo para el combate contra este patógeno. En Figura 7.5 también se observó que la miel de *Melipona beecheii* posee el mismo efecto contra la *E.coli* ATCC 25922 disminuyendo su actividad hemolítica del 2.1% a un 0.9%. Tomando en cuenta que esta cepa no posee el plásmido pO157, y en teoría no posee el mecanismo para lisar a este tipo de células (glóbulos rojos), se puede sugerir que la miel de Melipona o algún compuesto bioactivo de ésta, podría estar protegiendo a los glóbulos rojos de una lisis enzimática o mecánica, ya que Manukumar y Umesha (2015) han reportado unas mieles locales de la India inhibió el daño de la membrana de los eritrocitos, la cual la hemólisis fueron inducidas por calor y por una solución hipotónica. El daño inducido por la solución hipotónica fue inhibida por la muestra acuosa de miel en un orden ascendente que varió de 8.25% a 97.76% de protección a 10-50 mg/mL y en la hemólisis inducida por calor mostró su propiedad protectora la solución acuosa de miel durante condiciones de estrés externo de 0.44% a 21.23 % a 10 a 50 mg / mL.

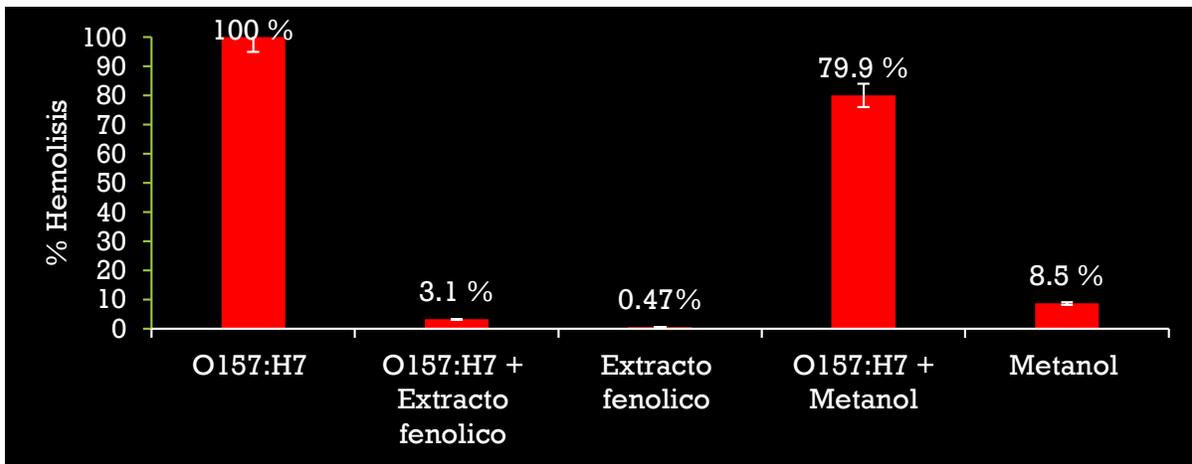


**Figura 7. 6** Actividad hemolítica de *E. coli* O157:H7 en presencia del extracto proteico de miel de *Melipona beecheii*.

Debido al porcentaje de hemólisis de la *E. coli* ATCC es significativamente bajo y esta no tiene la capacidad de lisar este tipo de células se evaluaron los extractos proteicos

y fenólicos sólo con la cepa hemorrágica. En la Figura 7.6 se observó que el extracto proteico disminuye la hemólisis un 98.5%, un poco más que la miel y el extracto por sí solo no mostró actividad hemolítica, lo que nos indica que el extracto proteico es inocuo, indicando que las proteínas de la miel de *Melipona beecheii* tienen un efecto antihemolítico.

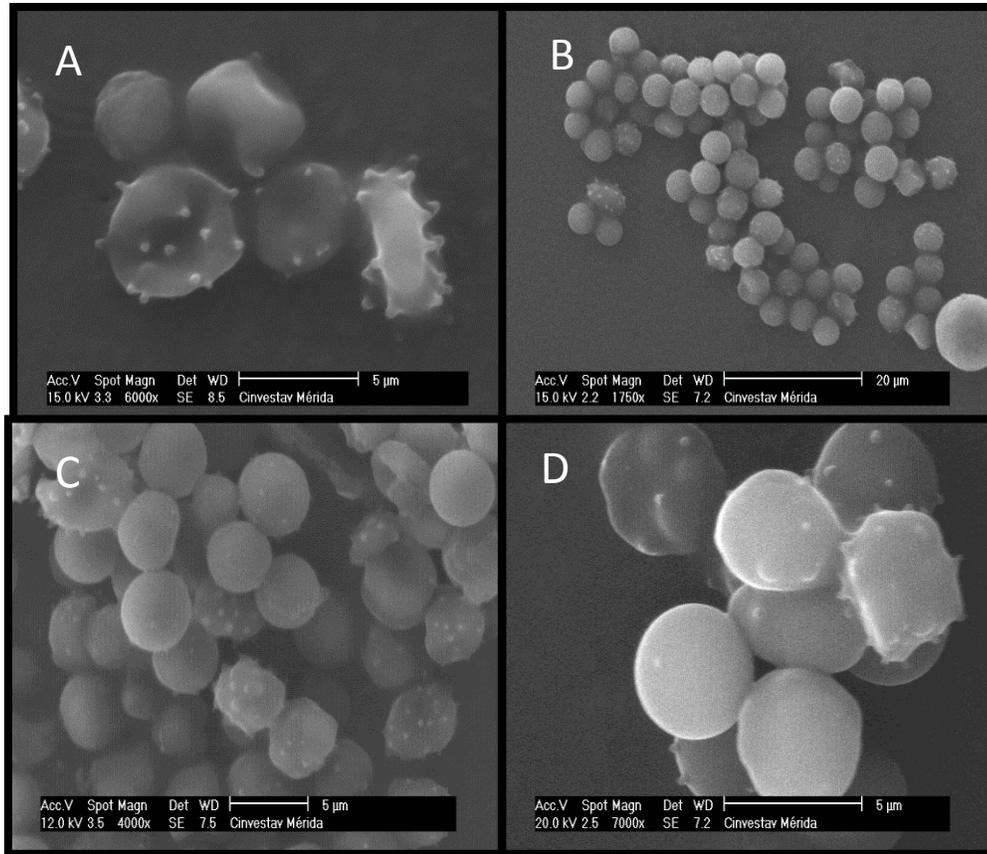
En la figura 7.7 se evaluó la actividad hemolítica en presencia del extracto fenólico y se observa que también al igual que el extracto proteico, en presencia de éste disminuyó su actividad en un 96.9%. El metanol por si solo presentó 8.5% de hemólisis y el extracto fenólico por si solo presentó 0.47%, lo que nos indica que el metanol es tóxico para las células sanguíneas pero en presencia de los compuestos fenólicos de la miel los protegen de alguna manera, evitando que sean lisados. Para corroborar que fueron los compuestos fenólicos de la miel los que están relacionados con la disminución de la actividad hemolítica, se evaluó metanol usando como principio el mismo volumen en el tratamiento en vez de la presencia del extracto fenólico, obteniendo un porcentaje de hemólisis de 79.9%. Aunque hay una reducción de porcentaje de hemólisis esto nos indica que el metanol es tóxico tanto para los dos tipos de células (sanguíneas y bacterianas), pero ésta no es suficiente para lisar a todos los glóbulos rojos ni a las células bacterianas, garantizando que son los compuestos fenólicos que disminuyeron la actividad hemolítica y no fue por muerte de la bacteria a causa del metanol. Los compuestos fenólicos también juegan un papel antihemolítico al igual de las proteínas, indicando que esos son los responsables de dicho efecto, interfiriendo con la capacidad de la *E. coli* O157:H7 para adquirir hierro, ya que es esencial para muchos procesos metabólicos. Faltaría hacer más estudios para determinar sus posibles mecanismos de acción de éstos compuestos bioactivos de la miel sobre el efecto antihemolítico que presentan.



**Figura 7. 7** Actividad hemolítica de *E. coli* O157:H7 en presencia del extracto fenólico de miel de *Melipona beecheii*.

## 7.6 Visualización de las hemólisis por SEM

Al evaluar la actividad hemolítica y al observar una disminución de la actividad en presencia de la miel y de los extractos se realizó una observación por microscopia electrónica de barrido para ver el estado en el que se encontraban los glóbulos rojos después del tratamiento. En la Figura 7.8 A se observó como la hemolisina producida por *E. coli* O157:H7 produce protuberancias en la pared celular en los glóbulos rojos, deformándolos llevando a la lisis celular, liberando el grupo hemo, dando el color rojo característico de la hemolisis, corroborando con el dato obtenido del 100% de hemolisis. En la Figura 7.8 B se observó que en presencia de la miel reducen las protuberancias provocadas por la bacteria, evitando la deformación de la pared celular de los glóbulos y ocurre una aglomeración de los mismos, éste resultado muestra el efecto protector que tiene la miel hacia este tipo de células sanguíneas.



**Figura 7. 8** Actividad hemolítica de *E. coli* O157:H7 visualizados por SEM. **A)** Hemolisis O157:H7, **B)** Tratamiento con miel, **C)** Tratamiento con el extracto proteico y **D)** Tratamiento con el extracto fenólico).

En la Figura 7.8.C se observó que las proteínas de la miel reducen la formación de las protuberancias de las paredes celulares de los glóbulos rojos y también se observó que las proteínas aglomeran a los glóbulos rojos protegiéndolos del ataque bacteriano, aunque en otro trabajo reportado por Brudzynski y Sjaarda (2015) indican que una fracción de glicoproteína rica en manosa causan un gran daño a la membrana de las células bacterianas que a los eritrocitos y tienen un efecto poco aglutinante en globulos rojos en murinos, pero un efecto mayor aglutinante y en bacterias *B. subtilis* (Gram +) y *E. coli* (Gram -). Caso contrario ocurrió en este estudio ya que las proteínas de la miel de *Melipona beecheii* disminuyeron las protuberancias provocadas por la *E. coli* O157:H7 en la pared celular de los eritrocitos de humanos, pero si concuerda con la

aglutinación de los mismo. Esto posiblemente se deba a que en el trabajo hecho por Brudzynski y Sjaarda son sólo de una fracción de glicoproteínas ricas en manosa, además es de otra especie de abeja y en este trabajo es un extracto de un conjunto de diversa naturaleza proteica. Posiblemente haya otros tipos de proteínas que tengan afinidad hacia otros compuesto patógenos secretados por las bacterias como la hemolisina, lo que da la baja actividad hemolítica y la disminución de las protuberancias.

De igual manera ocurre el mismo efecto con el extracto fenólico como se observa en la Figura 7.8.D posiblemente éstos compuestos fenólicos tengan otro u otros mecanismos de acción diferentes o semejantes a las proteínas. Por ejemplo que interaccionen con la hemolisina, oxidándola, provocando cambios en su estructura lo que provoque su inactividad. Otra propuesta es que los compuestos fenólicos de la miel se adhieran a la pared celular de los glóbulos promoviendo la aglomeración, y por impedimentos estérico la hemolisina no pueda actuar hacía la pared celular de los glóbulos rojos, ya que existen reportes de compuestos de naturaleza fenólica, que han demostrado poseer un efecto protector hacia los eritrocitos, interactuando con la membrana de los eritrocitos, evitando la Per oxidación lipídica (Alvarez *et al.*, 2012), Por otro lado Seong (2010) menciona la aglomeración de eritrocitos humanos en presencia de ciertos agentes catiónicos.

Otros autores han reportado la identificación de algunos compuestos fenólicos en la miel con propiedades terapéuticas y antimicrobianas como por ejemplo; Boanerges de Queiro *et al* (2013) identificaron en la miel de *Melipona compressipes manaosensis* la rutina, un flavonoide glucosidico, este presenta varias propiedades terapéuticas asociadas con la mejoría de síntomas relacionados con la insuficiencia linfático , vasos sanguíneos, enfermedades hemorrágicas, hipertensión y antioxidante, también este flavonoide se ha informado que se encuentra presente en la miel producida por la abejas *Apis sp*; Isla *et al* (2011) encontró pinocembrina en miles del noroeste de Argentina y presentaba efecto inhibitorio contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *M. morgani*; Tenore *et al* (2012) detecto también pinocembrina en

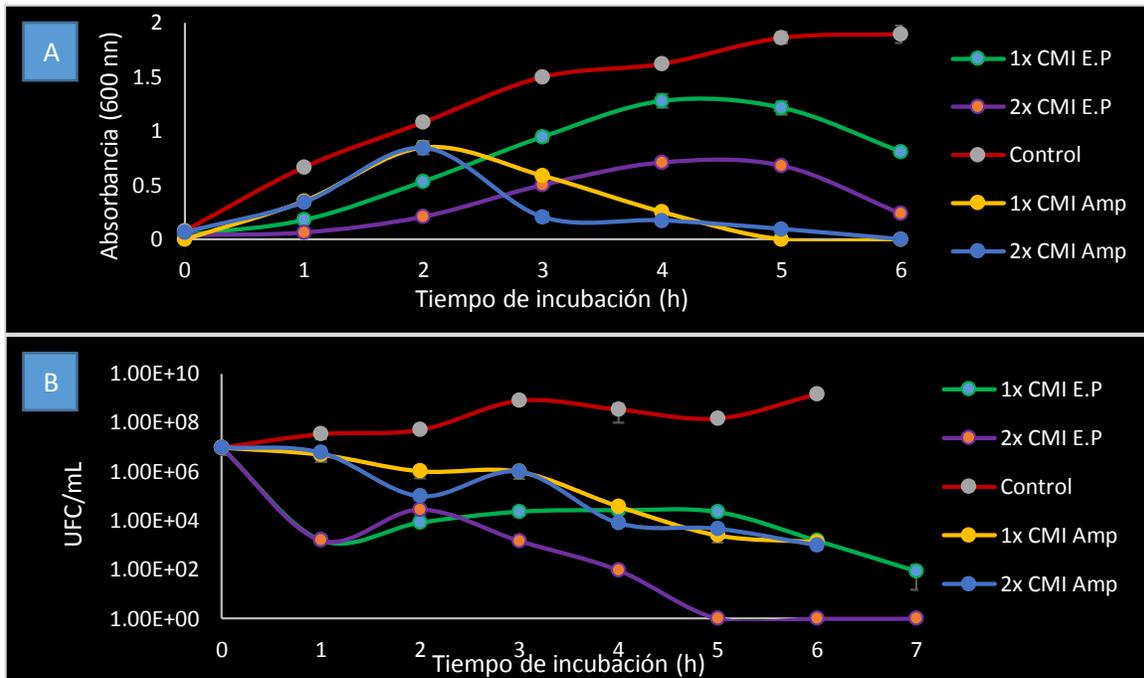
diferentes muestras de miel monoflorales de Italia; Kemjeric *et al* (2007) encontraron apigenina en muestras de miel en Croacia y Makevi *et al* (2009) lo encontraron en muestras de mieles de diferente origen botánico de diferentes regiones de Sudán; Weston *et al* (2000) encontraron sirangato de melito en miel de Manuka, el cual es el principal constituyente de la fracción fenólica de la miel de Manuka, y presenta actividad antibacteriana. Estos compuestos fenólicos posiblemente se encuentren en la miel de *Melipona beecheii* u otros compuestos aún no identificados sean los compuestos bioactivos de origen fenólico los que le den la propiedad de actuar como agentes antimicrobianos y ya sea que uno o varios compuestos fenólicos tengan un efecto anti hemolítico o protector hacia los glóbulos rojos como se parecía en las pruebas de hemólisis y la visualización por SEM después de la hemólisis.

### **7.7. Curvas de letalidad de *E. coli* O157:H7 en presencia de la miel y de los extractos proteicos y fenólicos.**

En la Figura 7.9.A se observan las diferentes cinéticas de crecimiento de *E. coli* O157:H7. De color rojo es la cinética de crecimiento normal de la bacteria sin la presencia de ningún agente antimicrobiano (control), de color verde y morado las cinéticas de crecimiento en presencia del extracto proteico (EP) a las concentraciones 1x y 2x la CMI respectivamente (lo que equivale a 55 y 110 µg/mL del EP) y de color amarillo y azul las cinéticas de crecimiento de en presencia de la Ampicilina 1x y 2x respectivamente. Para esta prueba se determinó que la CMI de la Ampicilina contra *E. coli* O157:H7, fue de 35 µg/mL. La bacteria al estar con el extracto proteico 1x CMI se observó que hay una disminución de absorbancia a la primera hora de incubación, la cual va aumentando con el tiempo pero debajo del crecimiento normal, después de las 6h la absorbancia empieza a decrecer y al usar el doble (2x) de la CMI observamos que hay una relación dependiente con la inhibición de crecimiento y la concentración del EP, debido a que las absorbancias fueron menores que las de 1x. Si

comparamos las cinéticas de letalidad del EP se asemejan con las cinéticas de la ampicilina. Pero con un mayor efecto inhibitorio, lo que nos indica que posiblemente tiene un mecanismo de acción de inhibición en la biosíntesis de la pared celular bacteriana el EP.

Al hacer la resiembra en medio LB-agar después de cada hora de las cinéticas de letalidad y contar las células viables observamos que se inició con una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/mL y fue aumentando con el tiempo, pero en la presencia de 1x CMI E.P disminuye hasta  $1 \times 10^3$  UFC/mL en la primera hora, después se mantiene casi constante en las siguientes 4 horas hasta disminuir a una a  $1 \times 10^2$  UFC/mL a las 7 h, como se observa en la Figura 7.9 B, teniendo una mayor efecto de disminución de células viables con 2x CMI del E.P , lo cual acaba por completo con la *E. coli* O157:H7 a las 5 h. Esto sugiere que los daños estructurales inducidos por las proteínas de la miel a la pared celular son irreparables, llevando a la muerte celular y además esta bacteria es más susceptible a las proteínas de la miel de *Melipona beecheii* que a la ampicilina (usando 1x y 2x) .Estos resultados nos garantizan que el EP no sólo inhibe en crecimiento de esta cepa, sino que tiene la capacidad de lizarla, temiando el extracto proteico un efecto bactericida contra este serotipo de *E.coli*.



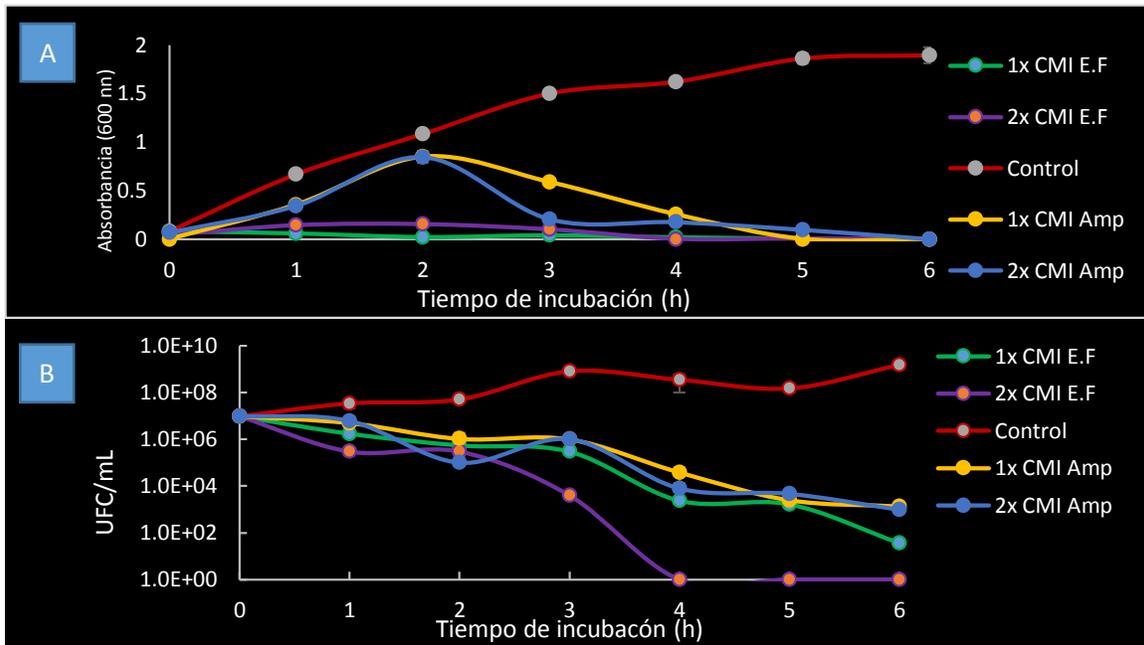
**Figura 7. 9 A)** Cinéticas de letalidad de *E. coli* O157:H7 expuesto con 1x y 2x CMI del extracto proteico de la miel de *Melipona beecheii* (EP), 1x y 2x CMI de ampicilina (Amp). **B)** Cinéticas de muerte de *E. coli* O157:H7 a partir las células viables (UFC/mL) después de estar expuestas al EP y Amp.

Aunque no hay reportes de las proteínas de la miel de *Melipona beecheii* tienen efecto bactericida contra *E. coli* O157:H7, pero hay trabajos donde indican que las proteínas de la miel producida por ésta abaja es bactericida contra *E. coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* (Ramón, 2011), también hay estudios donde glicoproteínas de la miel de Apis tienen actividad bactericida contra *E. coli* ATCC 14948 usando 1x la CMI (13.8 µg/mL) debido a que no se encontraron células sobrevivientes utilizando la resiembra en placas y al usar 0.5x CMI redujo el crecimiento sólo en un 50% durante los primeros 15 minutos, aunque después de ese tiempo, se observó una disminución constante en las tasas de crecimiento, alcanzando finalmente 80% (Brudzynski y Sjaarda, 2015)

En la Figura 7.10 A se observan las cinéticas de letalidad de *E. coli* O157:H7 en presencia de 1x y 2x CMI del extracto fenólico (EF), de color verde y morado respectivamente (lo que equivale a 180 y 360 µg/mL del EF). Estas cinéticas nos mostraron que al estar la bacteria en presencia de los compuestos fenólicos de la miel no permite el crecimiento de la misma, por lo que indica la baja absorbancia de casi cero en la primera hora de incubación la cual continúa hasta inhibirla completamente. Podemos observar que no hubo una relación de inhibición al duplicar la CMI del EF. También se pudo observar que las cinéticas de letalidad del EF no se asemejan con las cinéticas de letalidad de la ampicilina, indicando posiblemente que los compuestos fenólicos de la miel poseen otro u otros mecanismos de acción diferente a la ampicilina, siendo también diferente al de las proteínas. Como perspectivas para elucidar el mecanismo de acción de las proteínas y los compuestos fenólicos de la miel de *Melipona beecheii* es realizar más cinéticas de letalidad con antibióticos de diferentes mecanismos de acción.

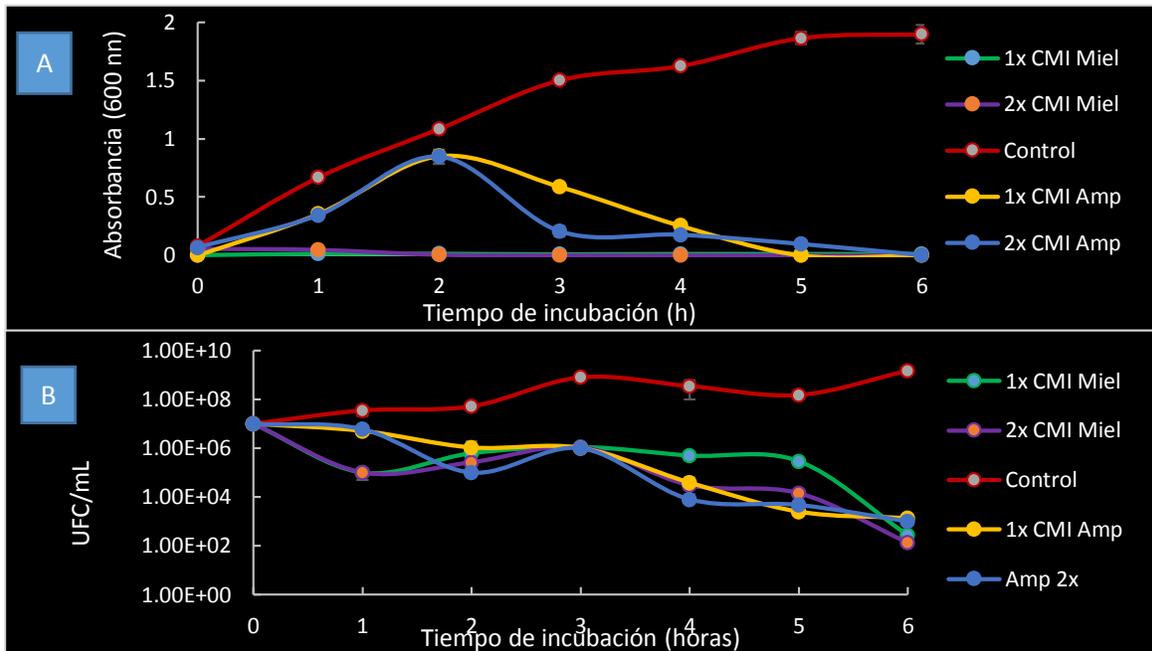
Al analizar el conteo de células viables (UFC/mL) de la cinética de letalidad con el 1x y 2x CMI del EF, éstas disminuyen de una concentración inicial de  $1 \times 10^7$  UFC/mL a  $1 \times 10^6$  y a  $3 \times 10^5$  UFC/mL respectivamente en la primera hora, ambas continúan disminuyendo con el tiempo las células viables pero habiendo un mayor efecto en 2x CMI del E.F, ya que liso completamente las células bacterinas a las 4h de incubación como se observa en la Figura 7.10 B, también se observó que con 1x CMI del EF disminuye un poco más las células viables a las 6 h con  $1 \times 10^2$  UFC/mL en comparación de con 1x y 2x CMI de ampicilina que tuvo  $1 \times 10^3$  UFC/mL.

El extracto fenólico también tuvo un efecto bactericida al igual que el extracto proteico, pero con un posible mecanismo de acción diferente al de la ampicilina contra *E. coli* O157:H7.



**Figura 7. 10 A)** Cinéticas de letalidad de *E. coli* O157:H7 expuesto con 1x y 2x CMI del extracto fenólico de la miel de *Melipona beecheii* (E.F). **B)** Cinéticas de muerte de *E. coli* O157:H7 a partir de las células viables (UFC/mL) después de estar expuesta con E.F y Amp.

En la Figura 7.11.A se observa las cinéticas de letalidad de *E. coli* O157:H7 en presencia de 1x y 2x CMI de miel lo que equivale a 17 y 34 % (v/v) de miel respectivamente. Las absorbancias medidas en cada hora fueron de cero en todo el tiempo del tratamiento y presenta las cinéticas de letalidad de miel un perfil muy semejante a las cinéticas de letalidad del EF. Esto posiblemente se debe que en miel de *Melipona beecheii* hay una mayor concentración de compuestos fenólicos (133 µg EAG/µL de EF) que de proteína (2.7 µg/µL EP), estos tengan un mayor efecto en la letalidad del microorganismo patógeno o también como la miel es un mezcla de diversos compuestos estos estén actuando en sinergismo y por eso se observa una inhibición completa en presencia de ésta.

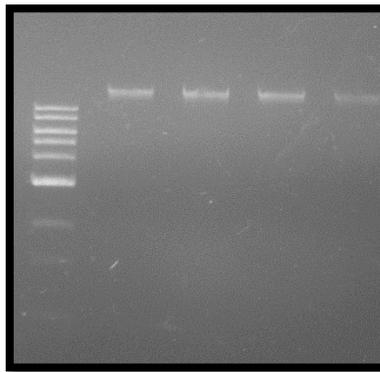


**Figura 7. 11 A)** Cinéticas de letalidad *E.coli* O157:H7 medido por densidad óptica expuesto con 1x y 2x CMI de miel de *Melipona beecheii*. **B)** Cinéticas de muerte de *E.coli* O157:H7 medidas por las células viables (UFC/mL) después de estar expuesta con 1x y 2x CMI de miel de *Melipona beecheii*.

El conteo de células viables (UFC/mL) muestran disminución de células viables con respecto al tiempo después de haber estado en presencia de la miel como se observa en la Figura 7.11B aunque no fue suficiente para acabar con toda la carga microbiana a las 6 h si fue suficiente para lisar la gran mayoría de células, debido a los compuestos bioactivos de la miel no tienen la disponibilidad debido a su difusión por la viscosidad de la miel por lo que no permite que interactúen completamente los compuestos bioactivos con la bacteria. Pero éste resultado indica que utilizando bajos porcentajes de miel es posible evitar que se desarrolló este patógeno y la miel presenta tener actividad bactericida al igual de los extractos proteicos y fenólicos.

### 7.8 Validación de los genes housekeeping y de virulencia de *E. coli* O157:H7 a partir de DNA.

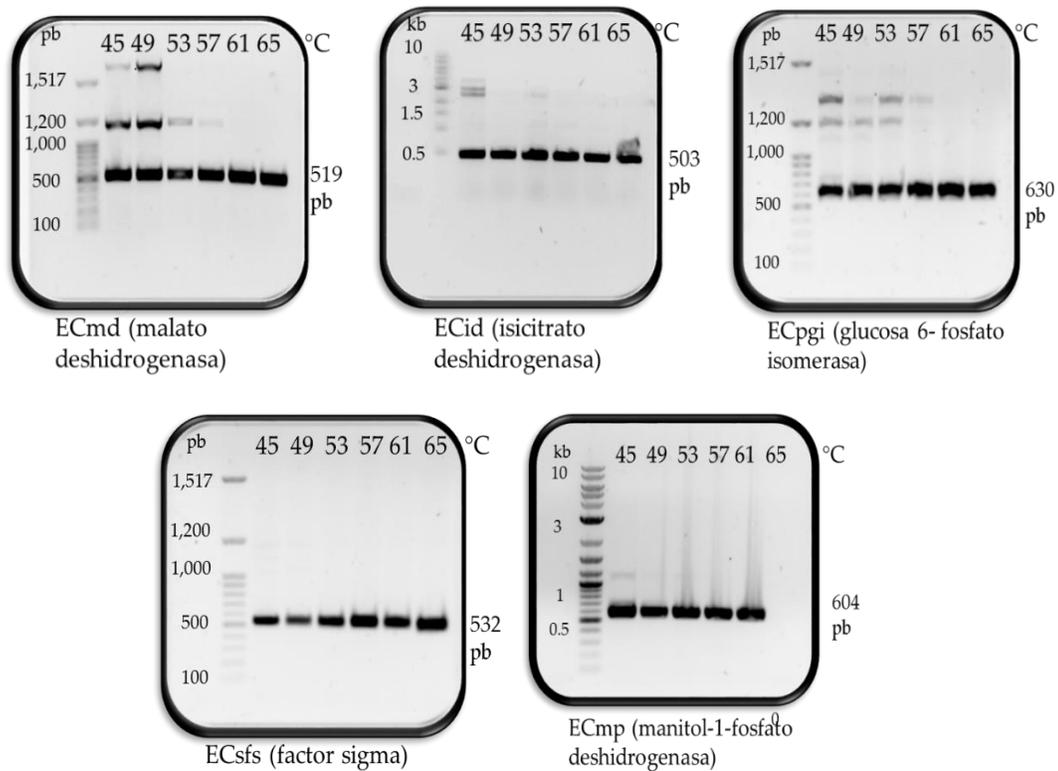
Previo a la validación de los genes en estudio, se procedió a la estandarización del protocolo de extracción del ADN bacteriano. En la Figura 7.12 se puede observar una banda definida el cual se realizó por cuadruplicado, lo cual nos indica un ADN íntegro de *E. coli* O157:H7. Esto indica que la extracción se realizó correctamente, debido a que no se mostró la presencia de ARN.



**Figura 7. 12** Visualización del ADN bacteriano de *E.coli* O157:H7 por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%

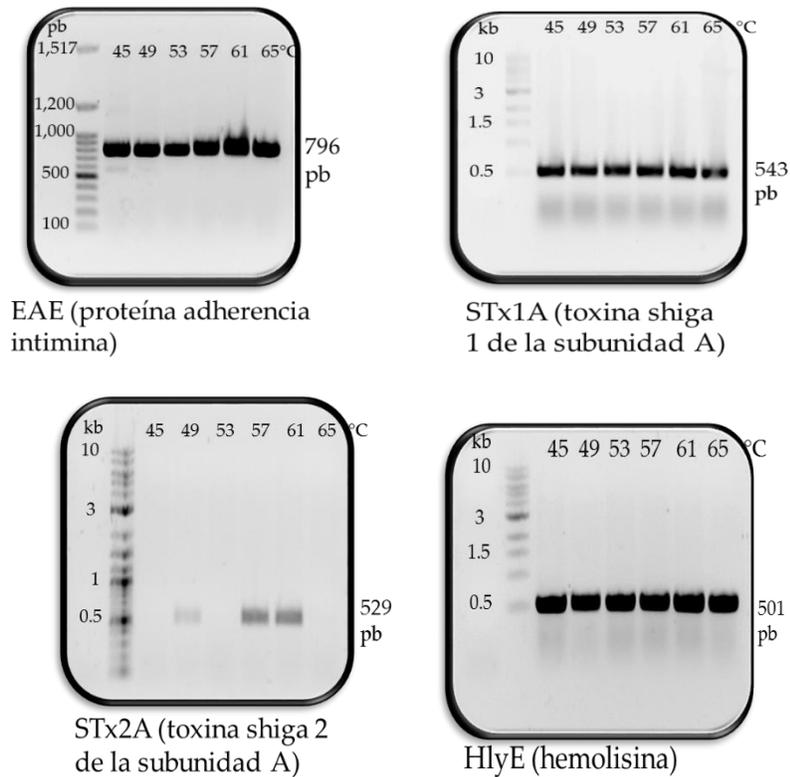
Una vez obtenido el ADN molde sea realizó la detección de los genes housekeeping y de virulencia. Los 5 genes housekeeping (ECmd, ECpgi, ECid, ECsfs y ECmp) amplificaron en las pares de bases esperados como se muestra en la Figura 7.13. El gen ECsfs fue específico a todas las temperaturas evaluadas; Los genes ECmd y ECpgi fueron específicos a 61 y 65°C; el gen ECmp fue específico a las temperaturas de 49 y 61°C, y para el gen ECid fue específico a las temperaturas de 49, 61 y 65 °C.

Estos resultados nos indican que los genes housekeeping evaluados se encuentran dentro del genoma de *E.coli*, los oligos para PCR de los genes housekeeping fueron diseñados correctamente y la temperatura específica de los oligos diseñados para cada gen, el cual nos dará la pauta para la evaluación de la expresión de éstos genes



**Figura 7. 13** Validación de la presencia de los genes housekeeping de *E. coli* O157:H7 por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%.

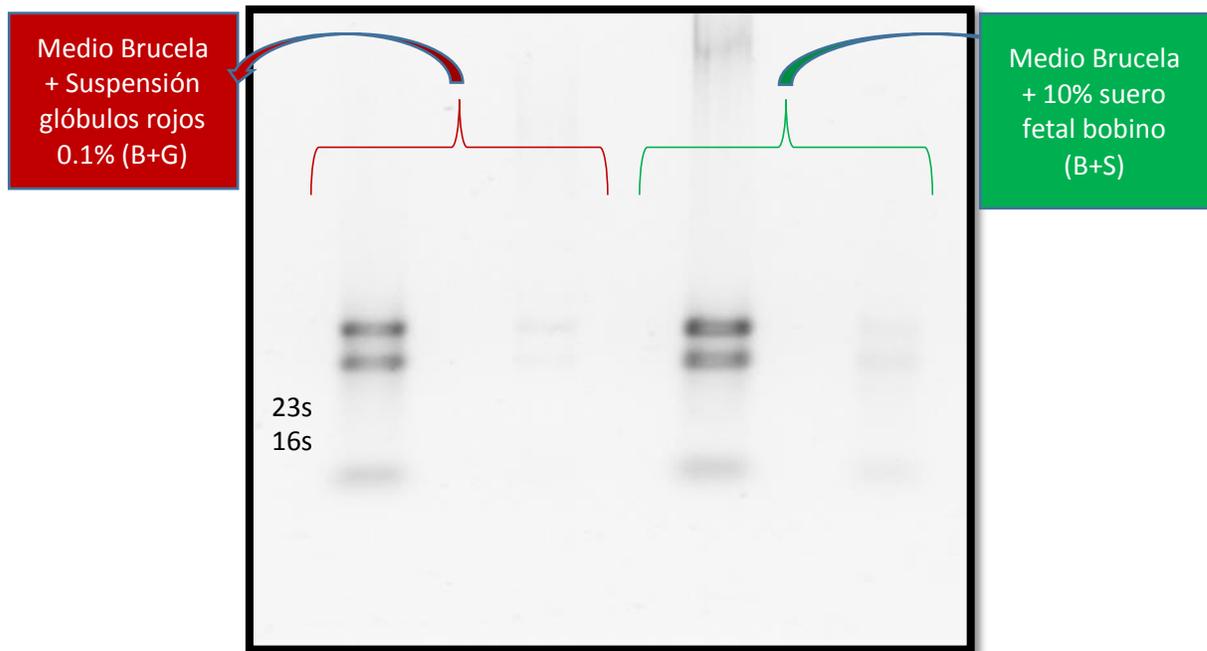
De igual manera se validaron la presencia de los genes de virulencia, para los cuales todos los oligos diseñados para cada gen de virulencia amplificaron a los pares de bases esperados como se observa en la Figura 7.14. Para el gen EAE fue inespecífico únicamente a 45°C porque se observa una banda no tan nítida debajo del amplicón esperado, para los genes Stx1A y HlyE fueron específicos en todas las temperaturas evaluadas y para el gen Stx2A fue específico solamente las temperaturas de 49, 57, y 61°C. Lo cual con este resultado afirmamos que la *E. coli* enterohemorrágica si es del serotipo O157:H7 ya que posee la capacidad de producir las dos tipos de Toxinas Shiga el cual se le considera ser el principal factor de virulencia de esta cepa hemorrágica y el plásmido pO157 que codifica a la hemolisina.



**Figura 7. 14** Validación de la presencia de los genes de virulencia de *E. coli* O157:H7 por electroforesis en gels de agarosa al 0.8%.

### 7.9 Extracción de ARN de *E. coli* O157:H7 y validación de la expresión de los genes housekeeping y de virulencia de *E. coli* O157:H7 a partir de cDNA.

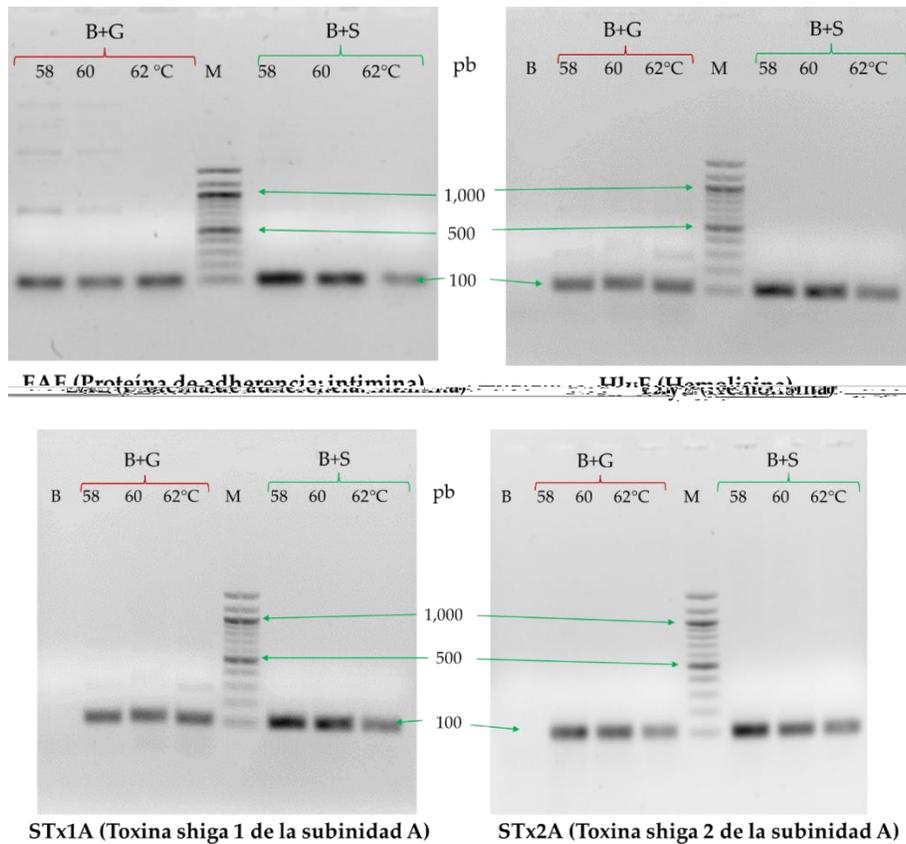
Para la evaluación de la expresión de los genes de virulencia de *E. coli* O157:H7 por RT-PCR fue necesario contar con un medio de cultivo donde se expresen los cuatro genes de virulencia a evaluar de *E. coli* O157:H7. Es por eso que se cultivó en los medios B+G y B+S, a ambos se le realizó la extracción de ARN y se visualizó en un gel de agarosa al 0.8%. En la Figura 7.15 se observa el ARN bacteriano íntegro, ya que se observaron dos bandas nítidas, características del ARNr 23s y 16s y se encuentra libre de DNA.



**Figura 7. 15** Visualización de los dos fragmentos de ARN de *E. coli* O157:H7 crecido en los medios B+G y B+S por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%

Una vez obtenido el ARN limpio e íntegro se pasó a cDNA, seguido, se realizaron reacciones de PCR en gradiente de temperatura de 58, 60 y 62°C. En la Figura 7.16 se observa los genes de virulencia Stx1A, Stx2A, EAE y HlyE amplificaron a los 100 pares de bases esperados, lo que indica que el diseño de los oligos para PCR-RT se realizaron correctamente e igual indica que se está llevando la transacción de los genes de virulencia, lo cual se están expresando tanto en el medio de cultivo brúcela suplementado con glóbulos rojos (B+G) así como en el suplementado con suero fetal bovino (B+S), pero no todos los genes de virulencia fueron específicos sus oligos a las tres temperaturas evaluadas al inducirlos diferentemente. Los oligos diseñado para los genes EAE, HlyE y Stx1A mostraron ser inespecíficos a las temperaturas en el medio B+G, ya que se observan otros amplicones a parte de los 100 pb esperados, siendo específicos solamente en el medio B+S. Solo los oligos para el gen Stx2A fueron específicos a las temperaturas evaluadas en los dos medios suplementados diferentemente.

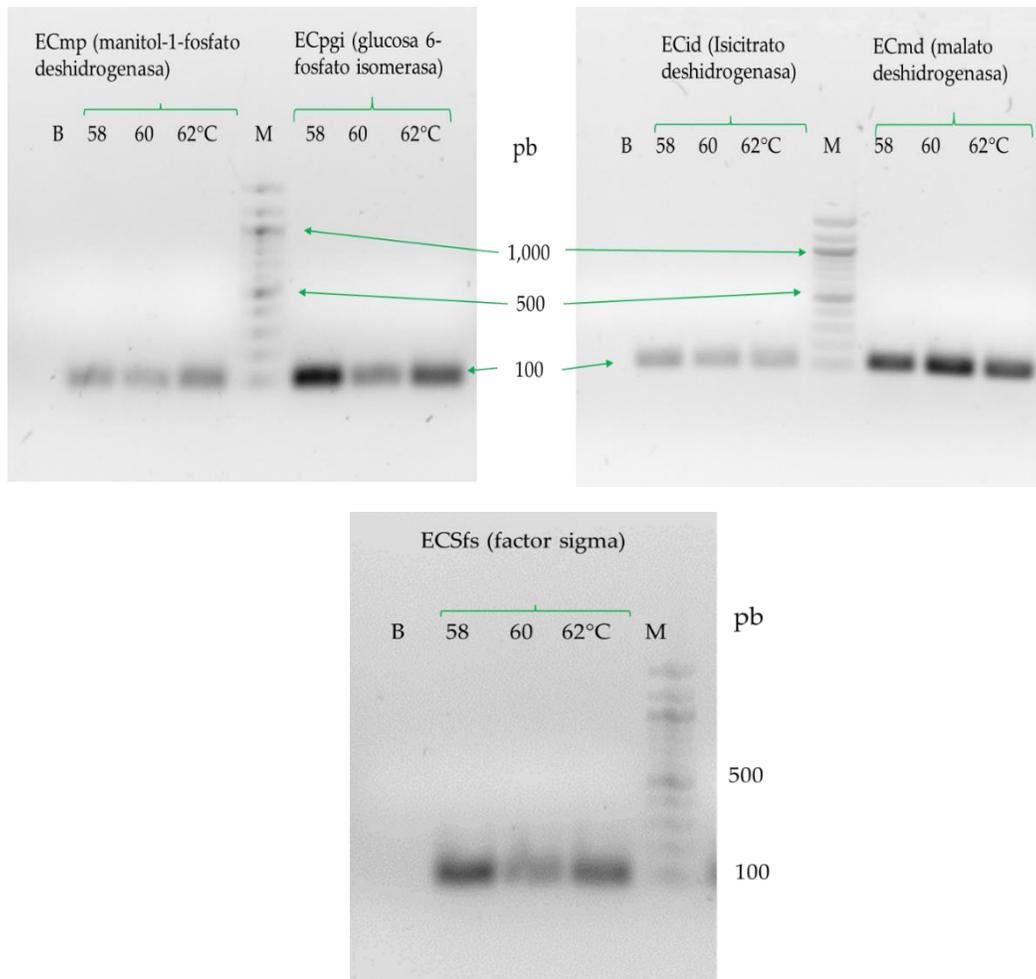
## Capítulo 7 Resultados y discusión



**Figura 7. 16** Detección de la expresión de los genes de virulencia de *E. coli* O157:H7 a partir de ADNc crecido en medio de Brucella suplementado con 0.1% de glóbulos rojos (B+G) y 10% de suero feral bovino (B+S) por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%.

Debido a que los oligos de los cuatro genes de virulencia fueron específicos en el medio de cultivo B+S, se optó por utilizar este medio, para la expresión de los genes housekeeping, debido a que todos los genes de virulencia se expresaron en este medio y fueron específicos a las tres temperaturas evaluadas. En la Figura 7.17 se observan los genes housekeeping (ECid, ECmd, ECmp, ECsfs y ECpgi) que amplificaron a las tres temperaturas evaluadas en los 100 pares de bases esperados, lo cual nos indica que los oligos de RT-PCR de estos genes son específicos a las temperaturas de 58, 60 y 62°C y se puede trabajar a cualquiera de estas tres temperaturas para la expresión de los genes por -RT- PCR.

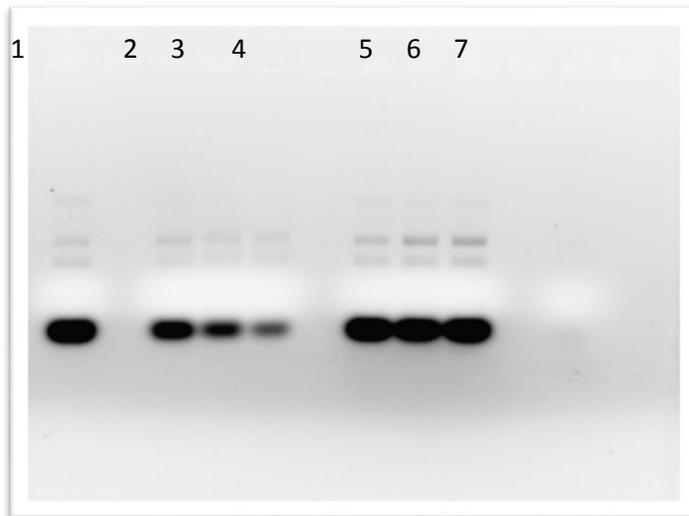
## Capítulo 7 Resultados y discusión



**Figura 7. 17** Detección de la expresión de los genes housekeeping de *E. coli* O157:H7 a partir de ADNc crecido en medio B+S.

### 7.10 Extracción y cuantificación de ARN de *E. coli* O157:H7 crecido en concentración subletal de miel y EP.

El mejor medio de cultivo para inducir los cuatro genes de virulencia y los genes housekeeping de *E. coli* O157:H7 fue el medio B+S. Se creció la bacteria enterohemorrágica en este medio de cultivo en presencia de concentraciones subletales (1/2, 3/4 y 6/7x CMI) de miel, EP y EF, esto para saber a qué concentración se obtenía más biomasa y obtener una mayor concentración de ARN para los estudios de los niveles de expresión de los genes de virulencia transcritos después de estar en tratamiento con la miel, E.P y E.F. Seguido se realizó la extracción de ARN a todas las muestras y el resultado fue que usando 1/2, 3/4 y 6/7x CMI se obtuvieron buenas cantidades de biomasa y se visualizó el ARN en geles de agarosa al 0.8% como se observa en la Figura 7.18.



**Figura 7. 18** Visualización de los fragmentos de ARN de *E. coli* O157H7 crecido en concentraciones sub-letales de miel y E.P. por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

EL ARN extraído crecido en las concentraciones sub-letales de EF fue degradado (dato no mostrado), por lo que se prosiguió esta parte del estudio en adelante con solo los ARNs extraídos a partir de los tratamiento con miel y el EP. Se utilizó un ARN control el cual fue sin ningún tratamiento. Los ARNs obtenidos en las concentraciones sub-letales de miel y de EP se observan íntegros, libres de ADN, observando 2 bandas nítidas las cuales son características del ARN ribosomal 23s y 16s.

**Tabla 7. 3** Cuantificación de ARN de *E. coli* O157 con/sin tratamiento de miel y Extracto proteico (EP).

	Concentración (ng/μL)	Abs 260 /280
Control (sin tratamiento)	780.8	1.95
	697.3	1.97
	Promedio 739.04 ± 59	
<i>E. coli</i> O157H7	182.2	1.91
6/7x CMI Miel	182	1.91
Con tratamiento	Promedio 182.1 ± 0.14	
	656	1.99
6/7x CMI EP	662.3	1.99
	Promedio 659.15 ± 4.45	

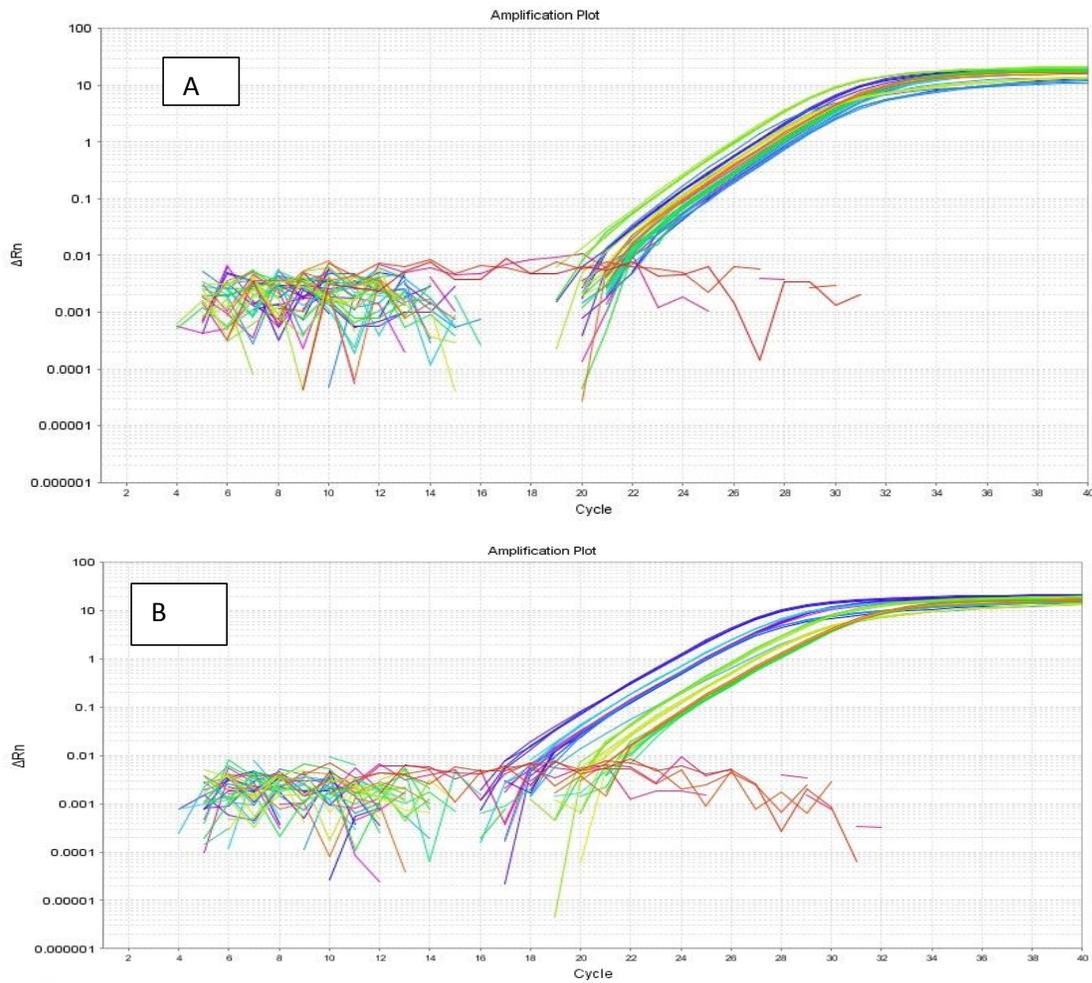
± es la desviación estándar.

Una vez verificado el ARN extraído se optó por usar el ARN de los tratamientos 6/8x CMI de ambos tratamientos (miel y E.P) para evaluar los niveles de expresión de los genes de virulencia, debido a que es una concentración sub-letal alta para ver el efecto que tiene la miel y el E.P y se cuantificó como se observa en la Tabla 7.3. Se obtuvo

una concentración promedio de ARN control de 749.04 ng/ $\mu$ L de ácidos nucleicos y con el tratamiento con miel y extracto proteico se obtuvo una concentración promedio de 182.1 y 659.15 ng/ $\mu$ L de ácidos nucleídos respectivamente. Indicando que la extracción de ARN se obtuvo una alta concentración de ARN, el cual además la relación de Abs 260/280 en todas las muestras fueron mayores de 1.8 y menores a 2 lo cual nos indica la pureza de nuestro ARN extraído y además es ausente de contaminantes por ADN y proteínas (Nolan, 2006). Este ARN se pasó a cDNA con los cebadores de las colas poli A, seguido el cDNA se diluyó a una relación 1:125 para obtener una concentración aproximada de 100 ng de cDNA y obtener valores de  $C_T$  entre los ciclos ideales entre 20 y 30.

#### **7.11 Amplificaciones de los genes housekeeping y virulencia de *E. coli* O157:H7 por qRT-PCR y el Análisis de las curvas de melting**

Los resultados de la amplificación de los genes ECid, ECpgi, EAE, Stx1A y HlyE por RT-PCR en presencia de la miel se muestran en la Figura 7.19 A, en la cual se pudo observar que los genes amplificaron entre los ciclos 20 y 30, indicando que los resultados obtenidos son adecuados para hacer el análisis en la expresión de los genes de virulencia en presencia de la miel y de igual manera se observó en presencia del EP como se muestra en la Figura 7.19 B.

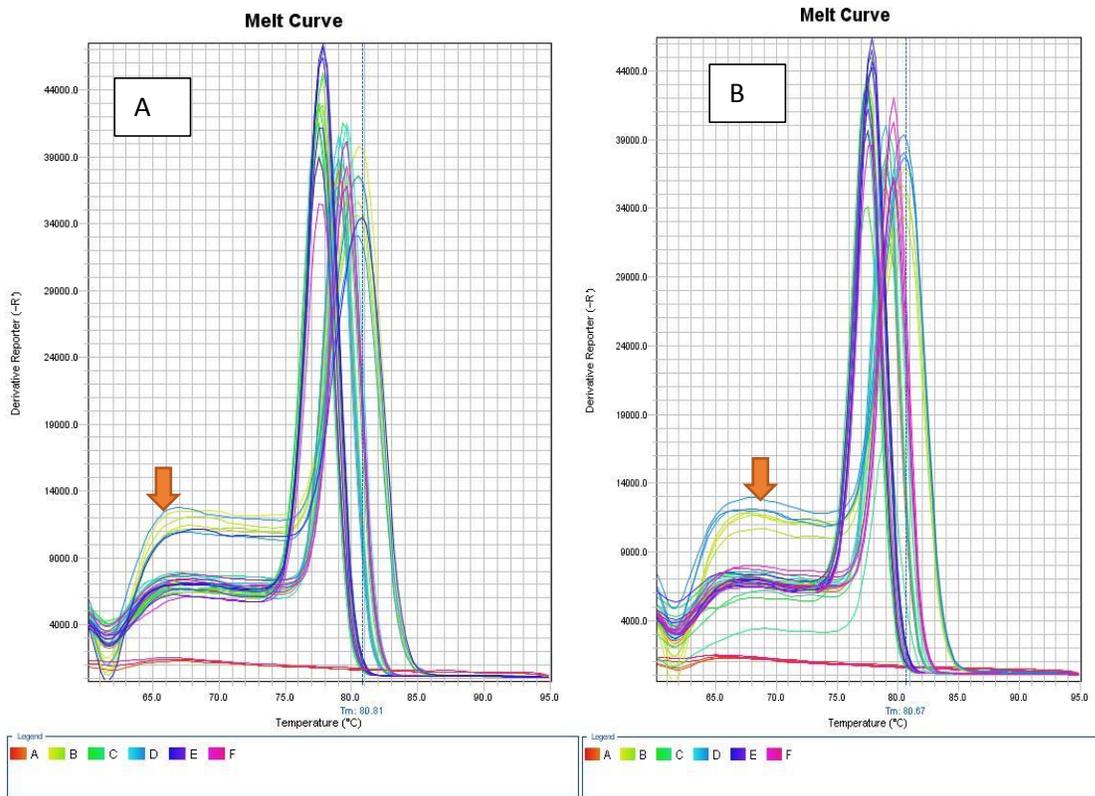


**Figura 7. 19** Figura Amplificación de los genes ECid, ECpgi, EAE, Stx1A y HlyE por RT-PCR. **A)** En presencia de 6/8x CMI de miel. **B)** En presencia de 6/8x CMI del E.P.

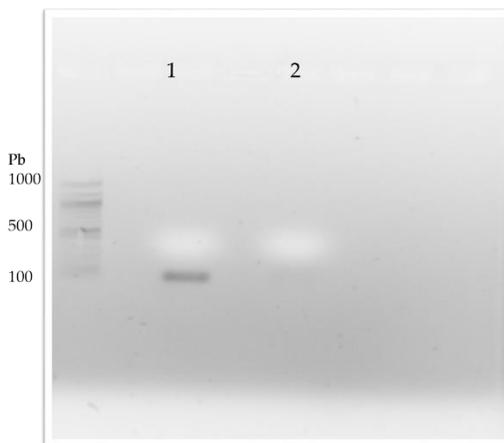
Para verificar que los valores de  $C_T$  sean los correctos después de la amplificación por RT-PCR para cada uno de los tratamientos de miel y el EP, se analizaron las curvas de melting para verificar que los genes hayan amplificado un único producto en su temperatura de fusión específica ( $T_m$ ). En la Figura 7.20 se observan las curvas de melting para los genes Stx1A, EAE, ECpgi y ECid, los cuales muestran un único pico de amplificación para cada gen, indicando la especificidad de la reacción, es decir, que los amplicones que se formaron son del tamaño esperado. La línea de abajo corresponde al control negativo, el cual no amplificó, a diferencia del gen HlyE (curvas de color verde limón y azul claro marcado con una flecha) mostró un pico entre la

temperatura de 65 a 70 °C en ambos tratamientos, indicando que los oligos para el gen HlyE no fueron específicos.

Para descartar que los oligos para el gen HlyE no se hayan contaminado, debido a que aparece otra elevación en la curva de melting. Se realizaron dos reacciones de PCR, en la primera usando los oligos *Forward* y *Reverse* y en la segunda reacción sólo el oligo *Forward* y se visualizó por electroforesis como se observa en la Figura 7.21 la cual muestra en el carril 1 el gen HlyE amplificó a los 100 pb esperados sin mostrar otro impicón diferente y el carril 2 no amplificó, el cual nos indica que los oligos *Forward* y *Reverse* para el gen Hemolisina no están contaminados, aunque fue específico para la PCR no lo fue para la RT-PCR debido a que el equipo para esta última técnica es más sensible y una de las desventajas de usar el SBYR Green es que puede unirse a cualquier molécula de ADN, incluyendo a dímeros de oligos, lo que hace que se detectara otra señal a la esperada o posiblemente haya otra región parecida muy parecida a otro gen, dando como resultado otro pico (otra amplificación) en la curva de melting. Dado lo anterior se descartaron los valores de  $C_T$  del gen HlyE (Hemolisina).



**Figura 7. 20** Curvas de melting.de los genes EAE, Stx1A, HlyE, ECpgi y ECid. **A)** con/sin tratamiento 6/7x CMI miel de *Melipona beecheii*. **B)** Con/sin tratamiento 6/7x CMI extracto proteico de la miel de *Melipona beecheii*.

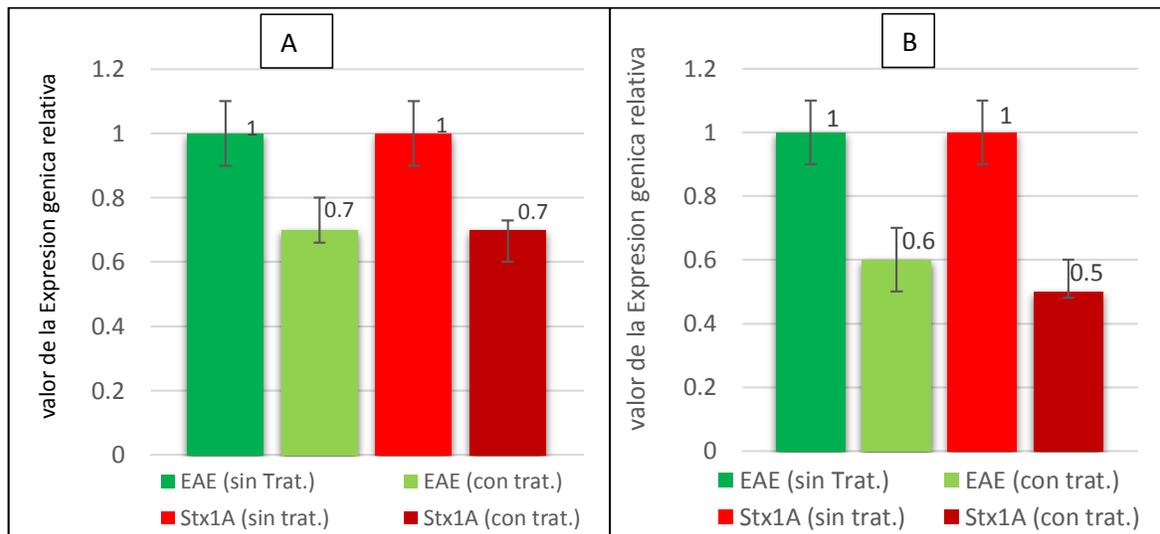


**Figura 7. 21** Visualización del gen HlyE por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Carril1- los oligos *Forward* y *Reverse*, Carril 2- Oligo *Forward*.

### 7.12 Evaluación de los niveles de expresión relativa de los genes de virulencia de *E. coli* O157:H7.

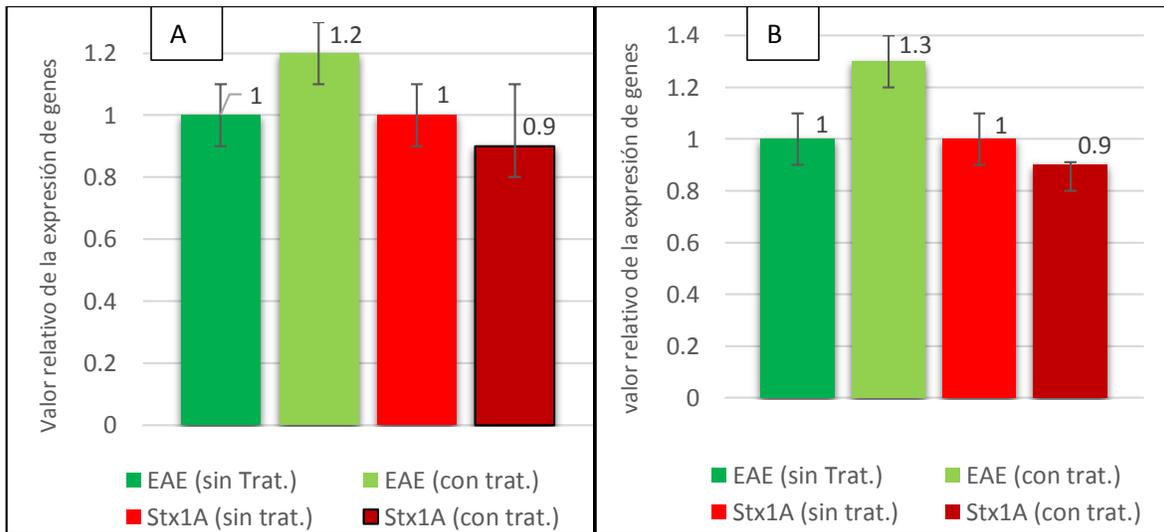
Los resultados de la cuantificación relativa de los genes de virulencia de Stx1A fueron calculados con el modelo matemático  $2^{-\Delta\mu C_T}$  usando los  $C_T$  de cada uno de los genes con/sin tratamiento, estos valores se encuentran en los anexos 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 9.

En la Figura 7.22.A observamos que al estar *E. coli* O157:H7 en presencia de la miel (6/7x CMI), sufre cambios en los niveles de ARNm transcritos de los genes EAE y Stx1A, ya que ambos disminuyeron hasta 0.3 veces menos la expresión de estos genes de virulencia comparado con el gen de referencia ECid (gen housekeeping). Los niveles de expresión de los genes de virulencia al compararlo con el gen de referencia ECpgi, éstos también disminuyen hasta 0.4 y 0.5 veces la expresión de los ARNm transcritos de EAE y Stx1A respectivamente (Figura 7.22).



**Figura 7. 22** Niveles de expresión relativa de los genes de virulencia stx1a y eae con tratamiento de miel de *Melipona beecheii*. **A)** Normalizado la expresión con el gen housekeeping ECid. **B)** Normalizado la expresión con el gen housekeeping ECpgi.

*E.coli* O157:H7 con tratamiento 6/7x CMI del extracto proteico mostró tener un efecto contrario con el gen EAE, ya que aumentó los niveles de expresión de los ARNm transcritos a 0.2 comprado con el gen ECid y 0.3 veces más comparado con el gen ECpgi como se observa en la Figura 7.23. El gen Stx1a no presentó una disminución significativa en presencia del EP, ya que sólo disminuyo 0.1 veces menos que los niveles normales de los ARNm transcritos comparado con los dos genes de referencia.



**Figura 7. 23** Niveles de expresión relativa de los genes de virulencia Stx1A y EAE con tratamiento del EP. **A)** Normalizado la expresión con el gen housekeeping ECid. **B)** Normalizado la expresión con el gen housekeeping ECpgi.

Este resultado nos indica que las proteínas de la miel por si solas no poseen ningún efecto en los niveles de expresión de los genes de virulencia pero si tienen un efecto antimicrobiano y protector hacia los eritrocitos como se vio en los resultados anteriormente. Y el aumento de los transcritos del gen EAE se debe probablemente a que la celda busca nuevas formas de adaptación para su supervivencia. Aunque no fue posible determinar los niveles de expresión de los genes de virulencia en tratamiento con el extracto fenólico, este nos hubiera dado la pauta de que tipos de moléculas son

las que tienen la característica de disminuir los niveles de expresión de los genes de virulencia o si en conjunto les brinda esa característica.

Estos resultados nos indican que los compuestos bioactivos no proteicos de la miel de *Melipona beecheii* son los responsables de estar provocando una disminución de los niveles de ARNm transcritos de los genes de virulencia EAE y Stx1A, ya sea a que los compuestos de la miel tengan afinidad hacia la molécula de ADN y éstas se estén adhiriendo en las partes reguladoras del operon de estos genes de virulencia, o que los compuestos bioactivos modifiquen la estructura de la proteína reguladora de los genes de virulencia EAE y Stx1A, o actúen directamente con la ARN polimerasa, provocando la disminución en los niveles transcritos de ARNm's, ya que se ha identificado en la miel de *Leptospermum scoparium* (Manuka) en Nueva Zelanda un compuesto denominado metilglioxal, un alfa-oxoaldehído, que reacciona con macromoléculas tales como ADN, ARN y proteínas (Adams et al., 2008; Mavric et al 2008), y además presenta actividad antimicrobiana (Cokcetin et al., 2016) por lo que posiblemente este compuesto se encuentre presente en la miel de *Melipona beecheii* o haya otros compuestos aún no identificados con un mecanismo igual o similar al del metilglioxal identificado en la miel de manuka.

Hay informes de algunas mieles que han mostrado tener un efecto en la expresión diferencial de un número de genes esenciales para la supervivencia, al estrés y la virulencia bacteriana. Blair et al (2009) reportó que ciertas mieles de *Leptospermum scoparium* obtenidos de Nueva Zelanda y Australia han demostrado que modulan la expresión de forma negativa de un gran conjunto de genes de *E. coli* (K-12), de los cuales se encuentran los implicados a la respuestas de estrés y la mayoría de los genes que se regularon de forma negativa por esta miel codifican los productos implicados en la síntesis de proteínas ribosómicas y factores de elongación. Lee et al (2011) han demostrado diferentes tipos de miel a bajas concentraciones de orígenes coreanos y estadounidenses que regulan negativamente la expresión de múltiples genes implicados en la formación de biopelículas, la detección de quórum, y genes de virulencia LEE (Adhesión/Borrado), incluyendo al gen EAE del patógeno *E. coli* O157:

H7. Wasfi *et al* (2016) reportaron tres mieles egipcias procedentes de diferentes fuentes florales (cítricos, trébol y Mejorana) contra *E. coli* ATCC 8739 que regulan negativamente los genes relacionados a la formación de biopelículas, detección de quórum y la supervivencia al estrés.

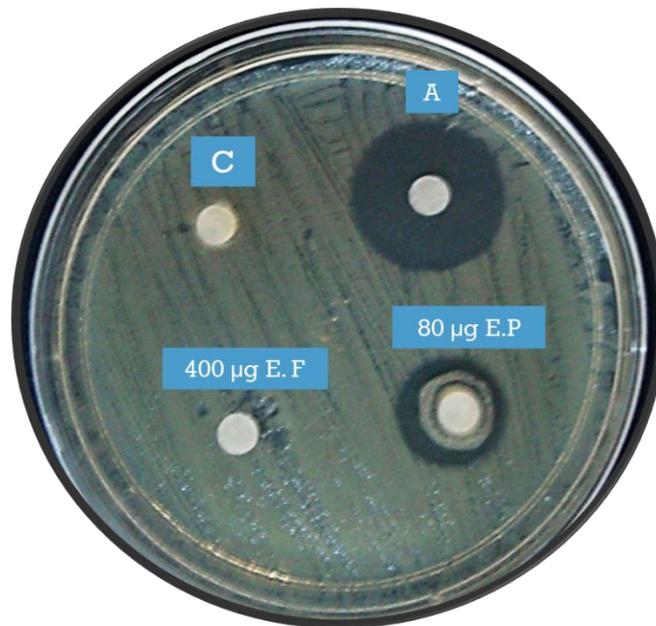
No existen reportes donde indiquen que la miel *Melipona beecheii* tienen efecto inhibitorio en la expresión de los genes de virulencia de *E. coli* O157:H7. Este es el primer trabajo donde se reporta que la expresión de los genes de virulencia puede ser regulada de manera negativa en presencia de la miel.

Los resultados de este trabajo nos dio información sobre posibles mecanismos de acción que tiene la miel, EF y EP contra *E. coli* O157:H7, también nos dio información que además de tener actividad antimicrobiana, presenta actividad antihemolítica y antiviral, siendo la miel de *Melipona beecheii* un candidato para combatir este patógeno de tipo enterohemorrágica para uso clínico ya que actualmente, el tratamiento de la infección de *E. coli* O157:H7 con fármacos es considerado controversial. En los Estados Unidos, el tratamiento antimicrobiano general no se recomienda para el tratamiento de estas infecciones, debido a la posibilidad de difusión de la Toxina Shiga lo que conduce a Síndrome Urémico Hemolítico. Sin embargo, los ensayos *in vitro* en este trabajo tienen un gran impacto porque además de eliminar a la bacteria también se disminuyen los niveles de expresión de la toxina shiga y así reducir la progresión de la enfermedad al SUH en pacientes que contengan esta bacteria en su organismo. Hoy en día más del 10% de la mayoría de los aislamientos clínicos de *E. coli* enterohemorrágica son resistentes a antibióticos de uso clínico como a los sulfametoxazol y tetraciclina. La miel puede ser un candidato viable para el tratamiento de infecciones por esta bacteria patógena y no genere resistencia alguna debido a su compleja conformación de moléculas no genere resistencia, ya que ya que esta la fecha no se han reportado trabajos donde informen que algún tipo de cepas patógenas genere resistencia a la miel.

## Conclusiones

- La miel de *Melipona beecheii*, el extracto proteico y el extracto fenólico de la misma inhibieron el crecimiento de *E.coli* ATCC 25922 y *E. coli* O157:H7.
- La miel y sus extractos fenólico y proteico mostraron actividad bactericida contra *E.coli* O157:H7 requiriendo 0.7 veces más concentración de extracto fenólicos de la miel de melipona a comparación de *E.coli* ATCC 25922-
- La miel y sus extractos proteico y fenólico disminuyeron la actividad hemolítica de *E. coli* O157:H7, posiblemente inhibiendo la actividad de la hemolisina o protegiendo de alguna manera a los glóbulos rojos. Además, indujeron la aglomeración de los glóbulos rojos, reduciendo la formación de poros en la pared celular-
- Se corroboró el serotipo O157:H7 de la cepa enterohemorrágica de *E: coli* usada en este trabajo, mediante la amplificación de los genes correspondientes
- El medio de Brucella suplementado con 10% de suero fetal bovino fue el adecuado para inducir todos los genes de virulencia de *E. coli* O157:H7
- Se pudo comprobar que la miel de *Melipona beecheii* disminuye los niveles de expresión de los genes de virulencia EAE y Stx1A de *E.coli* O157:H7.
- Posiblemente los compuestos no proteicos de la miel de *Melipona beecheii* sean los responsables de la disminución de la expresión de los genes de virulencia EAE y Stx1A.

## Anexos



**Anexo 1** Actividad por difusión en disco contra *E. coli* O157:H7. 400 µg E.F es la cantidad del extracto fenólico extraído por el método de Zahra Can, 80 µg E.F es la cantidad del extracto proteico, C es control y A es ampicilina

## Anexo 2

	ECid $C_T$	EAE $C_T$	$\Delta C_T$ (EAE $C_T$ - ECid $C_T$ )	$\Delta \Delta C_T$ ( $\Delta C_T$ - $\Delta C_T$ Sin tratamiento)	Razón relativa de EAE normalizado sin tratamiento $\frac{-\Delta \Delta C_T}{2}$
Sin tratamiento					
	29.58	25.72			
	29.74	25.59			
	29.82	25.58			
	29.78	25.64			
promedio	29.73 ± 0.11	25.63 ± 0.06	-4.10 ± 0.16	0 ± 0.16	1 (0.9 - 1.1)
Con tratamiento (6/8 CMI del E.P)					
	26.92	22.52			
	26.93	22.56			
	26.87	22.56			
	26.87	22.56			
promedio	26.89 ± 0.03	22.55 ± 0.02	-3.08 ± 0.04	-0.25 ± 0.04	1.2 (1.1 -1.3)

± es la desviación estándar.

### Anexo 3

	ECpgi $C_T$	EAE $C_T$	$\Delta C_T$ (EAE $C_T$ - ECpgi $C_T$ )	$\Delta \Delta C_T$ ( $\Delta C_T$ - $\Delta C_T$ Sin tratamiento)	Razón relativa de EAE normalizado sin tratamiento 2 <sup>-<math>\Delta \Delta C_T</math></sup>
	29.79	25.72			
Sin tratamiento	29.74	25.59			
	29.65	25.58			
	29.62	25.64			
Promedio	29.7 ± 0.08	25.63 ± 0.06	-4.07 ± 0.07	0.0 ± 0.07	1 (1 - 1)
	26.93	22.52			
Con tratamiento (6/8 CMI del E.P)	26.9	22.56			
	26.78	22.56			
	26.93	22.56			
Promedio	26.89 ± 0.07	22.54 ± 0.02	-4.41 ± 0.08	-0.34 ± 0.08	1.3 (1.2 - 1.3)

± es la desviación estándar.

#### Anexo 4

	ECid $C_T$	Stx1A $C_T$	$\Delta C_T$ (Stx1a $C_T$ - ECid $C_T$ )	$\Delta \Delta C_T$ ( $\Delta C_T$ - $\Delta C_T$ Sin tratamiento)	Razón relativa de Stx1A normalizado sin tratamiento 2 <sup>-<math>\Delta \Delta C_T</math></sup>
	29.58	28.01			
Sin tratamiento	29.74	27.92			
	29.82	28.1			
	29.78	27.92			
Promedio	29.73 ± 0.11	27.98 ± 0.09	-1.74 ± 0.13	0.00 ± 0.13	1 (0.9 – 1.1)
	26.92	25.43			
Con tratamiento (6/8 CMI del E.P)	26.93	25.39			
	26.87	25.25			
	26.87	25.32			
Promedio	26.89 ± 0.03	25.35 ± 0.08	-1.55 ± 0.05	0.19 ± 0.05	0.9 (0.8 -1.2)

± es la desviación estándar.

## Anexo 5

	ECpgi C <sub>T</sub>	Stx1A C <sub>T</sub>	$\Delta C_T$ (Stx1A C <sub>T</sub> - ECpgi C <sub>T</sub> )	$\Delta\Delta C_T$ ( $\Delta C_T$ - $\Delta C_T$ Sin tratamiento)	razón relativa de Stx1A normalizado sin tratamiento $2^{-\Delta\Delta C_T}$
Sin tratamiento	29.79	28.01			
	29.74	27.92			
	29.65	28.1			
	29.62	27.92			
promedio	29.7 ± 0.08	27.98 ± 0.09	-1.71 ± 0.12	0.00 ± 0.12	1 (0.9 – 1.1)
	26.93	25.43			
Con tratamiento (6/8 CMI del E.P)	26.9	25.39			
	26.78	25.25			
	26.93	25.32			
promedio	26.88 ± 0.07	25.34 ± 0.08	-1.50 ± 0.05	0.21 ± 0.05	0.9 (0.8 – 0.9)

± es la desviación estándar.

## Anexo 6

	ECid $C_T$	EAE $C_T$	$\Delta C_T$ (EAE $C_T$ - ECid $C_T$ )	$\frac{\Delta \Delta C_T (\Delta C_T - \Delta C_T \text{ Sin tratamiento})}{\Delta C_T \text{ Sin tratamiento}}$	razón relativa de EAE normalizado sin $-\Delta \Delta C_T$ tratamiento 2
	29.69	29.2			
Sin tratamiento	29.83	29.09			
	29.62	29.1			
	29.86	29.18			
promedio	$29.75 \pm 0.11$	$29.14 \pm 0.06$	$-0.61 \pm 0.11$	$0.00 \pm 0.11$	1 (0.9 -1.1)
	30.13	29.74			
Con tratamiento (6/8 CMI Miel )	29.89	29.74			
	29.93	29.97			
	30.16	29.93			
promedio	$30.02 \pm 0.14$	$29.85 \pm 0.12$	$-0.18 \pm 0.18$	$0.43 \pm 0.18$	0.7 (0.7 - 0.8)

± es la desviación estándar.

## Anexo 7

	ECpgi C <sub>T</sub>	EAE C <sub>T</sub>	$\Delta C_T$ (EAE C <sub>T</sub> - ECpgi C <sub>T</sub> )	$\Delta\Delta C_T$ ( $\Delta C_T$ - $\Delta C_T$ Sin tratamiento)	Razón relativa de EAE normalizado sin tratamiento $2^{-\Delta\Delta C_T}$
	28.64	29.2			
Sin tratamiento	28.64	29.09			
	28.77	29.1			
	28.64	29.18			
	28.67 ± 0.06	29.14 ± 0.06	0.47 ± 0.1	0.0 ± 0.1	1 (0.9 – 1.1)
	28.52	29.74			
Con tratamiento (6/8 CMI Miel)	28.77	29.74			
	28.67	29.97			
	28.73	29.93			
promedio	28.67 ± 0.11	29.81 ± 0.12	1.22 ± 0.14	0.75 ± 0.14	0.6 (0.5 – 0.7)

± es la desviación estándar.

## Anexo 8

	ECid C <sub>T</sub>	Stx1A C <sub>T</sub>	$\Delta C_T$ (Stx1A C <sub>T</sub> - ECid C <sub>T</sub> )	$\Delta\Delta C_T$ ( $\Delta C_T$ - $\Delta C_T$ Sin tratamiento)	razón relativa de Stx1A normalizado sin tratamiento $2^{-\Delta\Delta C_T}$
	29.69	21.66			
Sin tratamiento	29.83	21.9			
	29.62	21.87			
	29.86	21.82			
	29.75 ± 0.11	21.81 ± 0.11	-7.94 ± 0.15	0.00 ± 0.15	1 (0.9 – 1.1)
Con tratamiento (6/8 CMI Miel )	30.13	22.6			
	29.89	22.66			
	29.93	22.57			
	30.16	22.98			
promedio	30.02 ± 0.14	22.70 ± 0.19	-7.32 ± 0.16	0.61 ± 0.16	0.7 (0.6 -0.7)

± es la desviación estándar.

## Anexo 9

	ECpgi C <sub>T</sub>	Stx1A C <sub>T</sub>	$\Delta C_T$ (Stx1A C <sub>T</sub> - ECpgi C <sub>T</sub> )	$\Delta\Delta C_T$ ( $\Delta C_T$ - $\Delta C_T$ Sin tratamiento)	razón relativa de Stx1A normalizado sin tratamiento $2^{-\Delta\Delta C_T}$
Sin tratamiento	28.64	21.66			
	28.64	21.9			
	28.77	21.87			
	28.64	21.82			
Promedio	28.6725 ± 0.06	21.8125 ± 0.11	-6.86 ± 0.1	0.0 ± 0.1	1 (0.9 – 1.1)
	28.52	22.6			
Con tratamiento (6/8 CMI Miel)	28.77	22.66			
	28.67	22.57			
	28.73	22.98			
Promedio	28.6725 ± 0.11	22.61 ± 0.19	-5.92 ± 0.17	0.94 ± 0.17	0.5 (0.5 - 0.6)

± es la desviación estándar.

## Bibliografía

- Abd El Moez Sherein I., Abdoon Ahmed S.S., Kandil Omaila M and Sabra Hussein A. (2013). Activity of Egyptian Cotton Flower Honey as Antimicrobial Agent Against Pathogens of Animal Origin. *Global Veterinaria* 11 (5): 568-574.
- Acheson D. W. K., Lincicome, L. L., De Breucker, S. and Keusch, G. T. (1996). Detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and milk by comercial enzyme immunoassay. *J. Food Prot.* 59: 344-349.
- Adams C.J., Boulton C.H., Deadman B.J., Farr J.M., Grainger M.N.C., Manley-Harris M., Snow M.J. (2008) Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr Res* 343(4): 651–659.
- Administración de Drogas y Alimentos (FDA), (2013). Informe sobre alimentos y medicamentos de los Estado Unidos.
- Administración de Drogas y Alimentos (FDA), octubre (2006). <http://www.fda.gov/AboutFDA/EnEspañol/default.htm>
- Alekshun MN y Levy SB (2007). Mecanismos moleculares de la resistencia a múltiples fármacos antibacterianos. *128 (6): 1037-1050.*
- Alvarez-Suarez J., Tulipani S., Romandini S., Vidal A.Y., Battino M. (2009). Methodological aspects about determination of phenolic compounds and in vitro evaluation of antioxidant capacity in the honey: A Review. *Curr. Anal. Chem.* 5:293-302.
- Alvarez-Suarez, José M. Francesca Giampieri, Ana M. González-Paramás, Elisabetta Damiani, Paola Astolfi, Gregorio Martinez-Sanchez, Stefano Bompadre, José L. Quiles, Celestino Santos-Buelga, Maurizio Battino (2012). Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology* 50; 1508–1516.

- Alzahrani A. M., Gherbawy Y. A., Sawant A. (2011). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains isolated from water springs in Al-Ahsa Region. *African J Microbiol.* 5 (2):123-130.
- Alzahrani H.A., Alsabehi R., Boukraâ L., Abdellah F., Bellik Y., Bakhotmah B.A. (2012). Antibacterial and antioxidant potency of floral honeys from different botanical and geographical origins. *Molecules* 17(9):10540-10549.
- Anduaem B. (2013) Combined anti-bacterial activity of stingless bee (*Apis mellipodae*) honey and garlic (*Allium sativum*) extracts against standard and clinical pathogenic bacteria. *Asian Pac J Trop Biomed*;3:725e 31.
- Badawy O.F.H., Shafii S.S.A., Tharwat E.E., Kamal A.M. (2004). Antibacterial activity of bee honey and its therapeutic usefulness against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* infection. *Rev. Sci. Technol. Int. Epiz.* 23:1011-1122.
- Barnes H. J., Vaillancourt J. P., Gross W. B. (2003). "Colibacillosis" Diseases of Poultry. 11th Edition, Section II, Chapter 18.
- Bergan, J., Dyve Lingelem A. B., Simm R., Skotland T. and Sandvig K. (2012). Shiga toxins. *Toxicon.* 60: 1085-1107.
- Beutin L., Geier D., Steinruck H., Zimmermann S., Scheutz F. (1993). "Prevalence ad some properties of verotoxin (Shiga-like-toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals" *Journal of Clinical Microbiology.* 2483-2488.
- Bizani, D., Dominguez, A., and Brandelli, A. (2005). Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. *Letters in Applied Microbiology.* 41, 269-273.
- Blair S.E., Cokcetin N.N., Harry E.J., Carter D.A. (2009) The unusual antibacterial activity of medical-grade *Leptospermum* honey: antibacterial

spectrum, resistance and transcriptome analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 28(10):1199–208.

- Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Alonso M.P., González E.A., Bernárdez M.I. (2002). Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia* In: Manual de Microbiología Veterinaria, Vadillo S, Píriz S, Mateos E, Eds., McGraw-Hill Interamericana España. 301-325.
- Blanco J., Blanco M., Mora A., and Blanco J. (1997). “Production of toxins (enterotoxins, verotoxins and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity” *Journal of Clinical Microbiology*, November. 2956-2957.
- Blanco M., Blanco J. E., Mora A., Rey J., Alonso J. M., Hermoso M., Hermoso J., Alonso, M. P., Dahbi G., González E. A. (2003). Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 1351-1356.
- Bogdanov S, Jurendic T, Gallmann P. (2003). Honey for nutrition and health. *Journal Medical Food*, 1-12.
- Bollgag, D.M. (1996). *Protein Methods*. Wiley liss a john pulications.
- Burland V, et al. 1998. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res*. 26:4196 – 4204.
- Campos J.F, dos Santos U. P, Macorini L.F , de Melo A.M, Balestieri J.B, Paredes-Gamero E.J. Cardoso C.A, de Picoli-Souza K., dos Santos E.L. (2014). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbigny* (Hymenoptera, Apidae). *Food Chem Toxicología*, 65: 374-380

- Carrillo Magaña F. (1990). Glosario de terminologías maya-yucatecas referentes a la cría de abeja indígena de Yucatán Mérida, México: Universidad de Riverside, sosmay.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). [Http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html](http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html)
- Chandran A., Mohamed Hatha A.A., Varguese S., Mony Sheeja K. (2008). Prevalence of multiple drug resistant *Escherichia coli* serotypes in a tropical estuary, India. *Microbes Environ.* 23 (2):153-158.
- Chan-Rodríguez, David., Ramón-Sierra, Jesus., Lope-Ayora, Jorge., Sauri-Duch, Enrique., Cuevas-Glory, Luis and Elizabeth Ortiz-Vázquez. (2012). Antibacterial Properties of Honey Produced by *Melipona beecheii* and *Apis mellifera* against Foodborn Microorganisms. *Food Sci. Biotechnol.* 21 (3): 905-909.
- Clarke S.C., Haigh R.D., Freestone P.P., Williams P.H. (2003). Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol.* 16(3):365-378.
- Cokcetin Nural N., Pappalardo Matthew, Campbell Leona T., Brooks Peter, Carter Dee A, Blair Shona E., Harry Elizabeth J. (2016). The Antibacterial Activity of Australian *Leptospermum* Honey Correlates with Methylglyoxal Levels. *PLoS One.* 11(12).
- Consejo para la Información sobre Seguridad de Alimentos y Nutrición. (2011). brotes transmitidas por los alimentos. [http://www.cisan.org.ar/articulo\\_ampliado.php?id=173&hash=ba844db1cadff8ae52fa6d1c07de5019](http://www.cisan.org.ar/articulo_ampliado.php?id=173&hash=ba844db1cadff8ae52fa6d1c07de5019)
- Cooper R., Molan P., Harding K.(1999) Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. *J. Roy. Soc. Med.* 92: 283-285.

- Cooper, R., Molan, P. and Harding, K. (2002). The sensitivity to honey Gram positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *Journal of Applied Microbiology*. 93: 857-863.
- da Silva, I. A. A., da Silva, T. M. S., Camara, C. A., Queiroz, N., Magnani, M., Santos-De Novais, J., Bastos-Soledade, L.E., De Oliveira-Lima, E., De Souza, A.L., Gouveia-De Souza, A. (2013). Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chemistry*, 141(4), 3552-3558.
- D'Aoust, J. Y. (1997). *Salmonella* Species. En Food Microbiology: fundamentals and frontiers. Edited by Doyle, M. P., Beuchat, L. R., and Montville, T. J. Washington D.C.
- Dardón María José y Enríquez Eunice. (2008). Caracterización fisicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (*Meliponini*) de Guatemala. Interciencia, *Asociación Interciencia Caracas, Venezuela*. Vol. 33, núm. 12. 16-922.
- De Muradian Almeida, Ligia B., Klaus M. Stramm., Andreia Horita., Ortrud M. Barth., Alex da Silva de Freitas y Leticia M. Estevinho. (2013). Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*. *International Journal of Food Science and Technology*. 48: 1698–1706.
- De Souza, Silvana Alves., Camara, Celso Amorim., Sarmiento da Silva, Eva Monica and Sarmiento Silva, Tania Maria. (2013). Composition and Antioxidant Activity of Geopropolis Collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) Bees. *Evid Based Complement Alternat Med.*. 2013: 801383.
- DebMandal M., Mandal S. (2011). Honey:its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac. J.Trop. Biomed*. 1(2):154-160.

- DGEPI, Secretaría de Salud "Anuario de Morbilidad", (2006). ([www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx); consultado el 18/12/2006).
- Díaz C. (2003). Riesgo de Enfermedades Transmitidas por el agua en zonas rurales. <http://tierra.rediris.es/hidrored/ebooks/ripda/capitulo13.html>
- Donnenberg M. S., (2002). *Escherichia coli*: virulence mechanisms of a versatile pathogen. of plates. Academic Press, Amsterdam: London. 417-418.
- Doyle M. P., Beuchat L.R., Montville T.J. (2001). Food microbiology: fundamentals and frontiers. ASM Press, Washington, D.C.
- Eguiarte Qadri F., Svennerholm A.M., Faruque A.S., Sack R.B. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. Clin Microbiol; 18(3):465-83.
- Elizaquível P., Sánchez G. and Aznar R. (2011). *Escherichia*. In: Liu, D. (Ed.), Molecular detection of human bacterial pathogens. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 869-879.
- Estrada H., Gamboa M., Chávez C., Arias M. (2005). Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. Evaluación de su carga microbiológica. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica 55(2):167-171.
- Farrokh C., Jordan K., Auvray, F., Glass K., Oppegaard H., Raynaud S., Thevenot D., Condrón R., De Reu, K. and Govaris A. (2013). Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. Int. J. Food Microbiol., 162 (2): 190-212.

- Ferreres, F., Tomás Berberán, F., Soler, C., Ortiz, A and Tomás Lorente F. (1994). A simple extractive technique for honey flavonoid HPLC analysis. *Apidologie*. Vol. 25. 21-30.
- Fraser M.E., Fujinaga M., Cherney MM., Melton-Celsa A.R., Twiddy E.M., O'Brien A.D. & James MN. (2004). Structure of Shiga Toxin Type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *J. Biol. Chem.* 279(26), 27511-27517.
- French V.M, Cooper R.A, Molan P.C. (2005). The antibacterial activity of honey against coagulase-negative *Staphylococci*. *J. Antimicrob. Chemother.* 56(1):228-231.
- Garred O., van Deurs B., Sandvig K. (1995). Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J. Biol. Chem.* 270, 10817–10821.
- Giorgi A., Madero M., Baumgartner J y Lozzia g. (2011). The relationships between phenolic content, pollen diversity, physicochemical information and radical scavenging activity in honey. *Molecules*. Vol 16, 336-347.
- Gómez-Duarte Oscar G. (2014). Acute Diarrheal Disease caused by pathogenic *Escherichia coli* in Colombia. *Rev Chilena Infectol*; 31(5): 577–586.
- González-Flores T., Rojas-Herrera R.A. (2005). Enfermedades Transmitidas por Alimentos y PCR: Prevención y Diagnóstico. Unidad Sureste del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Guadalajara, Jalisco México. Salud Pública Cuernavaca.
- González-Núñez E.R. (2011). identificación de *Escherichia coli* diarreogénicas en muestras clínicas (heces) y de alimentos en el estado de Sinaloa. Escuela Superior De Medicina Sección De Estudios De Posgrado E Investigación del Instituto Politécnico Nacional.
- Gordon V.M., Leppla S.H. (1994). Proteolytic activation of bacterial toxins: role of bacterial and host cell proteases. *Infect. Immun.* 62, 333–340.

- Gyles C. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.*, 85: E45-E62.
- Hancock, H. (2007). Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacterial. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 5: 951-959.
- Harada K. y Asai T. (2010). Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animals in Japan. *J. Biom. Biotech.* 2010; 18 (6): 1-12.
- Heard T. (1999). The role of stingless bee in crop pollination. *Journals Entomology*. 44.1.183.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger G, Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. 11: 1026-1030.
- Isla M.A., Craig A., Ordoñez R., Zampini C., Sayago J., Bedascarrasbure E., Alvarez A., Salomón V, L. M. (2011). Physico chemical and bioactive properties of honeys from Northwestern Argentina. Vol (44), Issue 9: 922–1930.
- Kamakura, M., Fukuda, T., Fukushima, M., and Yonekura, Y. (2001). Storage-dependent degradation of 57-kDa protein in royal jelly: a possible marker for freshness. *Bioscience biotechnology and biochemistry*. 277-284.
- Kaper J. B., Nataro J. P., Mobley H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 123-140.
- Karmali M. A. (1989) "Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*" *Clinical Microbiology Review*. 2:15-38.
- Karmali M. A., V. Gannon & J. M. Sargeant, (2010) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol* 140: 360-370.

- Karmali M.A., Steele B.T., Petric M., Lim C. (1983). Casos esporádicos de síndrome urémico hemolítico en muestras de heces causada por *Escherichia coli*. Productora de citotóxicas Lancet; 1:619-620.
- Kauffmann F. (1966) "The Bacteriology of Enterobacteriaceae" Munksgaard. Copenhagen.
- Kenjeric D., Mandic M.L., Primorac L., Bubalo D., Perl A. (2007). Flavonoid profile of *Robinia* honeys produced in Croatia. Food Chem.102: 683-690
- Kuncic M.K, Jaklic D., Lapanje A., Gunde-Cimerman N. (2012). Antibacterial and antimycotic activities of Slovenian honeys. Br. J. Biomed. Sci. 69(4):154-158.
- Kwakman P.H.S, De Boer L., Ruyter-Spira C.P., Creemers-Molenaar T., Helsper J.P.F.G., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E., Zaat S.A.J, Te Velde A.A. (2011). Medical-grade honey enriched with antimicrobial peptides has enhanced activity against antibiotic-resistant pathogens. Eur. J. Clin. Microbiol. 30(2):251-257.
- Kwakman, L., Boer, L., Vandenbrouke, C., Schultz, M and Boszhard, L. (2011). Medical-grade honey enriched with antimicrobial peptides has enhanced activity against antibiotic-resistant. *European Journal Clinic Microbiologic Infect.* 30: 251-257.
- Le Minor, L. (1992). "The genus Salmonella" In The Prokaryotes. Vol. III. Edited by Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K. H. New York.
- Lee J.H., Park J. H., Kim J. A, Neupane G. P., Cho M.H., Lee C.S. (2011). Low concentrations of honey reduce biofilm formation, quorum sensing, and virulence in *Escherichia coli* O157:H7. Biofouling. 27(10):1095–104.
- Levine, M. M., "Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent" Journal of Infection Diseases, 1987, 155: 377-389.

- Lim J. Y., Yoon J., Hovde C.J. (2010) A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol* 20: 5-14.
- Livak Kenneth J. and Schmittgen Thomas D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Elsevier Science. Method* 25: 402-408.
- López-Saucedo C, Cerna Jorge, Villegas-Sepúlveda Nicolás, Thompson Rocío, F. Raul Valázquez, Torres Javier, Phillip i. Tarr and Teresa Estrada-García. (2003). Single Multiplex Polymerase Chain Reaction to detect diverse loci, associated with diarrheagenic *E. coli*. *Emerging Infectious Disease*, vol 9; 127-131.
- Lurlina, M.O. and Fritz, R. (2005). Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 297–304
- Makewi szám, Gadkariem E. A, Ayoub S.M.H., (2009). Determination of Antioxidant Flavonoids in Sudanese Honey Samples by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography. *E-Journal of Chemistry*. (6) S1: 429-S437
- Manukumar Honnayakanahalli Marichenne Gowda and Umesha. Sharanaiah. (2015) Assessment of membrane stabilizing activity from honey. An in-vitro approach. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 14 (1): 85–90.
- Margall, N., Domínguez, A., Prats, G., Salleras, L. (1997) “*Escherichia coli* Enterohemorrágico” *Revista Española de Salud Pública*. 71: 437-443.
- Martínez Guevara, José Luis. (2012). Evaluación del perfil y de la actividad antimicrobiana de un extracto de flavonoides obtenido de miel de *Melipona beecheii*. *Instituto Tecnológico de Mérida*.
- Masana M. O., G. A. Leotta L. L., Del Castillo B. A., D'Astek P. M., Palladino L. Galli E., Vilacoba C., Carbonari H. R (2010). Prevalence, characterization, and

genotypic analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of Argentina. *J Food Prot* 73: 649-656.

- Mavric E., Wittmann S., Barth G., Henle T. (2008). Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Mol Nutr Food Res* 52:483–489.
- McLoone Pauline, Warnock Mary, Fyfe Lorna. (2015). Honey: A realistic antimicrobial for disorders of the skin. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 49: 161-167.
- Mendieta J., Pagano F., Muñoz F., Daleo G., Guevara M. (2006). Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization. *Jornal Microbiology*. 154-154.
- Molan P.C. (1992). The antibacterial nature of honey. The nature of the antibacterial activity. *Bee World* 73(2):5-28.
- Molan P.C. (1999). Why honey is effective as a medicine. 1. Its use in modern medicine. *Bee World* 80: 80-92
- Mora A., Blanco J. E., Blanco M., Alonso M. P., Dhabi G., Echeita A., González E. A., Bernárdez M. I. and Blanco J. (2005). Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157: H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Res. Microbiol.*, 156: 793-806.
- Moriyama Y., Nelson N. (1988). Inhibition of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases by fusidic acid and suramin. *FEBS Lett*. 234(2), 383-386.
- Mulu A., Tessema B., Derby F., (2004). In vitro assessment of the antimicrobial potential of honey on common human pathogens. *Ethiopian J. Health Develop*. 18: 107-112.

- Old D. C., Threlfall E. J. (1998). “*Salmonella*” In: Microbiology and microbial infections, 1998, Vol. 2. 9 ed. Edited by Balows, A. and Duerden, B. I.
- OMS (2014). Cinco medidas sencillas permitirían reducir significativamente la incidencia mundial de enfermedades transmitidas por los alimentos. Bangkok (Tailandia).
- Organización Mundial de la Salud, OMS (2007), Red Internacional de las Autoridades en materia de inocuidad de los alimentos (INFOSAN) “Brote de *Escherichia coli* O157:H7 en espinacas”, nota informativa de INFOSAN N°01/2007.
- Organización Mundial de la Salud, OMS, Red Internacional de las Autoridades en materia de inocuidad de los alimentos (INFOSAN) “Brote de *Escherichia coli* O157:H7 en espinacas” 2007, nota informativa de INFOSAN N°01/2007.
- Parrilla-Cerrillo M.C., J.L. Vazquez-Castellanos E.O. Saldate-Castañeda y L.M. Nava-Fernández. (1993). Brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. Salud Pública de México. Vol 35 No.5:456-463.
- Pianciola L, Chinen I, Mazzeo M, Miliwebsky E, González G, Müller C, Carbonari C, Navello M, Zitta E, Rivas M.(2014). Genotypic characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains that cause diarrhea and hemolytic uremic syndrome in Neuquén, Argentina. *Int J Med Microbiol.* 304(3-4):499-504.
- Pimentel R.B., da Costa C. A., Albuquerque P. M., Junior S. D. (2013). Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manaosensis* and commercial honey. *BMC Complement Altern Med.*1: 13: 151.
- Pimentel RB, da Costa CA, Alburquerque PM, Junior SD. (2013). Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona*

compressipes manaosensis and commercial honey. *BMC Complement Altern Med.* 13:151.

- Qaiyumi, S., Schwalbe, R and Steele, A. (2007). Macro-and Microdilution Methods of Antimicrobial susceptibility Testing. *Antimicrobial susceptibility testing Protocols. New York: CPC Press Taylor and Francis Group.* 75-79.
- Quezada-Euán J, Parra A. (2005). Ecological and cultural role of stingless bee in Yucatan. pp. 20-22. In: *Biology and Use of Stingless Bee of Yucatan Peninsula.* Quezada-Euán J (ed). Editorial de la Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.
- Rajeswari T, Venugopal A, Viswanathan C, Kishmu L, Venil CK, Sasi kumar JM (2010). Antibacterial activity of honey against *Staphylococcus aureus* from infected wounds. *Pharmacologyonline* 1:537-541.
- Ramon Sierra, Jesús Manuel. (2012). Determinación del perfil proteico y actividad antimicrobiana de un extracto proteico total de la miel de *Melipona Beecheii*. *Instituto Tecnológico de Mérida.*
- Regua-Mangia Adriana Hamond, Gonçalves, M. Gonzalez, Aloysio M. F. Cerqueira, João Ramos C. Andrade (2012). Molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from different sources and geographic regions. *J. Vet. Sci:* 13(2), 139-144.
- Rodriguez-Angeles, M., (2002) "Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*" *Salud pública de México.* vol. 44, nº5.
- Romina J. Fernandez-Brando, LETICIA V. Bentancor, Maria Pilar Mejias, Analía C. Panek, Gabriel G. Cabrera, Ramon A. Exeni, Marina S. Palermo (2007). Actualización en el tratamiento del síndrome uremico hemolítico endémico patogenesis y tratamiento de la complicación sistémica más grave de las

infecciones por *Escherichia coli* productor de toxina shiga. *Medicina* (Buenos Aires). 71: 383-389.

- Rump L. V., Meng J., Strain E. A., Cao G., Allard M. W., and Gonzalez-Escalonad N. (2012). Complete DNA Sequence Analysis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Plasmid pO157\_2 in beta-Glucuronidase-Positive *E. coli* O157:H7 Reveals a Novel Evolutionary Path. *Journal of Bacteriology* Volume 194 Number 13. p.3457–3463.
- Ruppé Étienne, Paul-Louis Woerther, and François Barbier. (2015). Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli.. *Ann. Intensive Care*. 5:21
- Salim Máttar, Jorge Visbal S, German Arrieta. (2001). *E.coli* 0157: H7 enterohemorrágico: un agente etiológico
- Sandvig K, Torgersen ML, Engedal N, Skotland T, Iversen TG. (2010). Protein toxins from plants and bacteria: probes for intracellular transport and tools in medicine. *FEBS Letters*, 584, 2626-2634.
- Saravana Kumar J and Mandal M. (2009). Honey constituents and their apoptotic effect in colon cancer cells. *Journal of Apiprodukt and Apimedical Science*. Vol .1. 29-36.
- Schmidt H, Henkel B, Karch H. (1997). A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of Gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 148:265–272.
- Schmitzova J., Klaudivy J., Albert S., Schroeder W., Schreckengost W., Hanes J., Judova J., Simuth J. (1998). A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L., *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 1020–1030.

- Schneider M., Coyle S., Gow I., Fyfe L. (2013). Anti-microbial activity and composition of manuka and portobello honey. *Phytother Res*, 27:1162-1168
- Schroeder C. M., Zhao C., DebRoy C., Torcolini J., Zhao S., White D. G., Wagner D. D., McDermott P. F., Walker R. D. and Meng J. (2002). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 576-581.
- Sean D. Reid., Corinne J. Herbelin., Alyssa C. Bumbaugh., Robert K. Selander and Thomas S. Whittam. (2000). Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Institute of Molecular Evolutionary Genetics, Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania 16802, USA.*
- Seong-Cheol, P., Lee, J., Kim, J., Hwang, I., Nah, J. y Hyeonsook, C. (2010). A Novel antifungal protein from pumpkin rids. *Biotechnology Letters* , 32: 125-130.
- Sheikh D, Zaman S, Naqvi S, Sheikh M, Ali G.(1995). Studies on the antimicrobial activity of honey. *Pak. J. Pharm. Sci.* 8: 51-62.
- Shifrin Y., A. Peleg O. Ilan, C. Nadler S. Kobi K. Baruch G. Yerushalmi T. Berdichevsky S. Altuvia, M. Elgrably-Weiss C. Abe S. Knutton C. Sasakawa J. M. Ritchie M. K. Waldor & I. Rosenshine, (2008). Transient shielding of intimin and the type III secretion system of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* by a group 4 capsule. *J Bacteriol* 190: 5063-5074.
- Tan H.T., Rahman R.A., Gan S.H., Halim A.S., Hassan S.A., Sulaiman S.A. (2009). The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey. *BMC Complem. Altern. M.* 9:34.
- Taormina, P.J., Niemira BA. and Beuchat, LR. (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.

- Temaru, Emi., Satoshi Shimura., Kazuhiro Amano and Tadahiro Karasawa. (2007). Antibacterial Activity of honey from Stingless honeybees (*Hymenoptera; Apidae; Meliponinae*). *Polish Journal of Microbiology*. Vol. 56, No. 4: 281-285.
- Tenore G.C., Ritieni A., Campiglia P., Novellino E. (2012) Nutraceutical potential of monofloral honeys produced by the Sicilian black honeybees (*Apis mellifera ssp. sicula*). *Food Chem Toxicol*. 50(6):1955-61.
- Todar K. (2008). Pathogenic *E. coli* en <http://www.textbookofbacteriology.net/> University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology.
- Trabulsi L. R., Keller R. and Gomes T. A. T. (2002). Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging infectious diseases*. 8: 508.
- Turner R., Solberg O., Lee B., Raphael E., DebRoy C., Riley L. (2006). Global Spread of Mobile Antimicrobial Drug Resistance Determinants in Human and Animal *Escherichia coli* and *Salmonella* Strains Causing Community-Acquired Infections. *Clinical Infectious Diseases*. 49 (7): 365–71.
- Vattuone, Marta A., Quiroga Emma N., Sgariglia, Melina A., Soberón, José R., Jaime, Gloria S., Martínez Arriazu, Marta E., Sampietro, Diego A. (2007). 60-Compuestos fenólicos totales, flavonoides, prolina y capacidad captadora de radicales libres de mieles de *Tetragonisca angustula* FIEBRIGI (SCHWARZ, 1938) y de *Plebeia wittmanni*. *Boletín latinoamericana y del caribe de plantas medicinales y aromáticas*. 6: 299-300.
- Verónica Otero-Álvarez. (2014). Incidencia, Comportamiento y Control de Tipos Patógenos de *Escherichia coli* (STEC y EPEC) en Leche y Queso de Oveja. Universidad de León Facultad de Veterinaria Dpto. Higiene y Tecnología de los Alimentos.

- Vit, P., Soler, C., Tomás-Barberán, F.A. (1997). Profiles of phenolic compounds of *Apis mellifera* and *Melipona* spp. honeys from Venezuela. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 204(1), 43-47.
- Von Baum H. y Marre R. (2005).Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *Int. J. Med. Microbiol.* 295 (7): 503– 511.
- Wasfi Reham, Elkhatib Walid F, Khairalla Ahmed S. (2016). Effects of Selected Egyptian Honeys on the Cellular Ultrastructure and the Gene Expression Profile of *Escherichia coli*. PLoS ONE 11(3): e0150984.
- Welch, R. A. (2006). The Genus *Escherichia*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. and Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria: Vol. 6: Proteobacteria: Gamma subclass*. Springer, Singapore, pp. 60-71.
- Weston R.J., Brocklebank L.K., Lu Y. (2000). Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand Manuka honeys. *Food Chem.* 2000; 70:427-435.
- Zamora Luis Gabriel, Arias María Laura. (2011). Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón. Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales, Universidad Nacional, Costa Rica. *Rev Biomed.* 22:59-66.
- Zehra Can, Oktay Yildiz, Huseyin Sahin, Emine Akyuz Turumtay , Sibel Silici , Sevgi Kolayli. (2015). An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chemistry.* 180 (2015) 133–141.