



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

ITM

TESIS:

**CARACTERIZACIÓN DEL PROTEOMA DE LA MIEL DE
Apis mellifera Y SU CONTRIBUCIÓN EN LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA**

PARA OPTAR AL GRADO DE:

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

PRESENTA:

IBQ. EZEQUIEL LÓPEZ BAÑOS

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ELIZABETH DE LA LUZ ORTIZ VÁZQUEZ

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

13 DE DICIEMBRE DE 2018

DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
No. DE OFICIO: X-493/18

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN.

Mérida, Yucatán, **03/diciembre/2018**

C. LÓPEZ BAÑOS EZEQUIEL.
Pasante de Maestría en Ciencias de los
Alimentos y Biotecnología.
PRESENTE

De acuerdo al fallo emitido por su asesor la **Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez** y la comisión revisora integrada por el M.C. Jesús Manuel Ramón Sierra, 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.

“CARACTERIZACIÓN DEL PROTEOMA DE LA MIEL DE *Apis mellifera* Y SU CONTRIBUCIÓN EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA”

ATENTAMENTE
IN HOC SIGNO VINCES

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



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

C.p. Archivo
DAL5/fja,



SEP Instituto Tecnológico de Mérida. Km 5 Carretera Mérida-Progreso A.P 911
C.P 97118 Mérida Yucatán, México, Tels. 964-50-00, Ext. 10001, 10401
10601, 10201 e-mail:itm@itmerida.mx http://www.itmerida.mx

RECONOCIMIENTO
A LA CALIDAD SEP
2012
100 POR CIENTO EN
RESPONSABILIDAD DE
BUENA CALIDAD.



Si se nos presenta una idea no debemos rechazarla simplemente porque no está de acuerdo con las deducciones lógicas de una teoría aceptada.

-Claude Bernard, An introduction to the study of experimental medicine, 1813-

Este trabajo está dedicado principalmente a ti DIOS que sin merecerlo me diste la oportunidad de vivir y de tener a una grandiosa familia, a mis padres Juan Manuel y Delia, a mis hermanos Juan Habacuc y Angie Melina, a mis abuelos, Estela y Otilio los cuales siempre están ahí cuando los necesito. Por último y no menos importante a mi novia Anilú, pues ellos son los pilares de mi vida y me han otorgado y enseñado los valores necesarios para alcanzar cada logro y hacer frente a cada derrota. Sus esfuerzos incesantes han moldeado cada uno de mis pensamientos, y su amor desinteresado ha otorgado a mis actos una razón.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora y directora de tesis, la Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez por su amistad y por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio con un gran equipo de trabajo. Por su apoyo, confianza y guía en el desarrollo de la presente investigación, así como por los apoyos económicos y las facilidades otorgadas para la realización de la misma.

A mi asesor, el M. C. Jesús Ramón Sierra por todas las enseñanzas, tiempo, compañerismo, amistad y esfuerzo que me ha dedicado a lo largo de mis años dentro del laboratorio, esto con el fin de forjarme como investigador y principalmente como persona.

Quiero agradecer a los Doctores Jesús Alejandro Yam Puc y Denis Israel Magaña Ortiz por sus valiosos y sinceros comentarios, aportaciones, tiempo y empeño al presente estudio, muchas gracias.

Para mis amigos solo tengo palabras de agradecimiento, especialmente a Jesús, Gabriel, Leny, Soco y Enrique, por brindarme su amistad y respaldo en los buenos y malos momentos.

A mis compañeros del laboratorio de microbiología aplicada y molecular por haberme permitido convivir y colaborar con ellos en toda esta suntuosa estancia en el laboratorio.

ÍNDICE GENERAL

PÁGINAS

ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÒN	1
CAPITULO II	4
FUNDAMENTO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	4
2.1 ESTRÉS OXIDATIVO	4
2.1.1 Radicales libres	5
2.1.1.1 Clasificación de los radicales libres	6
2.1.1.2 Fuentes de radicales libres	7
2.1.2 Antioxidantes	8
2.1.2.1 Sistemas de defensa antioxidante de origen enzimático	9
2.1.2.2 Antioxidantes no enzimáticos provenientes de fuentes naturales	10
2.1.2.3 Estado redox a nivel celular	14
2.1.2.4 Proteínas antioxidantes	14
2.1.2.4.1 Proteínas antioxidantes provenientes de fuentes naturales	17
2.2 MICROORGANISMOS RESISTENTES A LOS ANTIBIÓTICOS	17
2.3 MIEL	19
2.3.1 Afecciones clínicas que responden al tratamiento con miel	19

2.3.2 Propiedades químicas y compuestos de la miel que brindan actividad antimicrobiana	21
2.3.3 Proteínas de la miel	23
2.3.3.1 Enzimas	23
2.3.3.1.1 α – Amilasas (EC 3.2.1.1)	23
2.3.3.1.2 β – Amilasas (EC 3.2.1.2)	23
2.3.3.1.3 α - Glucosidasa (EC 3.2.1.20)	24
2.3.3.1.4 Glucosa oxidasa (EC 1.1.3)	24
2.3.3.1.5 Catalasa (EC 1.11.1.6)	24
2.3.3.1.6 Proteasas (3.4.X.X)	24
2.3.3.2 Proteínas de origen no enzimático	25
2.3.3.2.1 MRJPs	25
2.3.3.2.2 Defensina – 1	26
2.3.3.3 Proteoma de la miel	26
2.3.3.4 Actividad antioxidante de proteínas de la miel	27
2.3.3.5 Proteínas de la miel como precursoras para la actividad antimicrobiana	28
JUSTIFICACIÓN	30
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS	32
Objetivo general	32
Objetivos específicos	32
CAPITULO III	33
MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	33
3.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LA MIEL	33
3.3 CUANTIFICACIÓN PROTEICA DEL EXTRACTO CRUDO	34

3.4 PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO PROTEICO DE LA MIEL	34
3.4.1 Cromatografía por afinidad	34
3.5 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICOS	35
3.5.1 SDS-PAGE	35
3.5.2 Zimograma	37
3.5.3 SDS-PAGE 2D	37
3.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	39
3.6.1 Captación del radical DPPH	39
3.6.2 Poder reductor de Fe (III)	39
3.6.3 Capacidad quelante de Cu ²⁺ .	40
3.7 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	41
3.7.1 Determinación de la Actividad antimicrobiana por difusión en disco	41
3.7.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante microdiluciones	42
3.7.3 Determinación del tipo de actividad antibacteriana	42
CAPITULO IV	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.1 CONTENIDO PROTEICO	44
4.2 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICOS	44
4.2.1 Por métodos desnaturalizantes (SDS-PAGE)	44
4.2.2 Identificación del proteoma	46
4.2.3 SDS-PAGE-2D	50

4.3 PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA MIEL DE APIS	52
4.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA	54
4.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	57
4.5.1 Actividad de captación de radicales libres por el método DPPH	57
4.5.2 Ensayo poder reductor de FeIII	60
4.5.3 Capacidad quelante de Cu ²⁺ del ECPMA	62
4.6 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	64
4.6.1 Actividad antimicrobiana por difusión en disco	64
4.6.2 Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima no inhibitoria (NIC)	66
4.6.3 Determinación de la actividad bactericida	70
4.6.4 Determinación de la actividad antimicrobiana de las fracciones (F1-F5) por difusión en disco.	73
CAPÍTULO V	77
CONCLUSIONES	77
ANEXOS	78
BIBLIOGRAFÍAS	80

ÍNDICE DE TABLAS

PÁGINAS

Tabla 1: Productos generados como resultado de la oxidación de ciertos aminoácidos y sus mecanismos de formación.	15
Tabla 2: Proteínas que se pueden encontrar en las bandas cortadas y posteriormente secuenciadas.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINAS

Figura 1: Sistema de defensa antioxidante en la célula.	9
Figura 2: Estructura del ácido ascórbico	11
Figura 3: Estructura del α -tocoferol (a) y α -tocotrienol (b)	11
Figura 4: Estructura de los carotenoides comúnmente encontrados en la dieta	12
Figura 5: Estructura de la apigenina	13
Figura 6: Glutati3n	13
Figura 7: Análisis electroforéticos del extracto proteico de la miel de <i>Apis mellifera</i> .	45
Figura 8: Bandas cortadas (A1-A7) obtenidas por métodos electroforéticos (SDS-PAGE) para secuenciar.	47
Figura 9: Perfil electroforético del ECPMA por la técnica de SDS-PAGE 2D. Los spots se encuentran marcados por círculos rojos.	51
Figura 10: Validación de la separación proteica del ECPMA por SDS-PAGE.	53
Figura 11: Zimograma. Carril I, ECPMA; carril II, F1; carril III, F2; carril IV, F3; carril V, F4, carril VI, F5.	54
Figura 12: SDS PAGE 2D de la fracción 1.	56
Figura 13: IC50 del ECPMA y de la fracción 1 obtenido por el método DPPH.	58

Figura 14: Porcentajes de inhibición de las fracciones 2-5.	59
Figura 15: IC50 del ECPMA y de la fracción 1 y 2 obtenido por el método reductor de FeIII.	61
Figura 16: Glicina y metionina incorporando a su estructura a un ion metálico	63
Figura 17: Actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco del ECPMA contra <i>Staphylococcus aureus</i> (A) y <i>Escherichia coli</i> (B). A1.5 = 1.5 mg, A1= 1 mg.	65
Figura 18: Diámetros de los halos de inhibición del ECPMA contra <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> .	65
Figura 19: MIC del ECPMA vs <i>S. aureus</i> obtenido por métodos estadísticos.	67
Figura 20: MIC del ECPMA vs <i>E. coli</i> obtenido por métodos estadísticos.	68
Figura 21: NIC del ECPMA vs <i>S. aureus</i> obtenido por métodos estadísticos.	69
Figura 22: NIC del ECPMA vs <i>E. coli</i> obtenido por métodos estadísticos.	69
Figura 23: Determinación de la actividad bactericida del ECPMA vs <i>S. aureus</i> mediante conteo de colonias. Control diluido 1000 veces (A). Tratamientos de 3200 y 1600 µg/mL (B y C respectivamente).	71
Figura 24: Determinación de la actividad bactericida del ECPMA vs <i>E. coli</i> mediante conteo de colonias. Control diluido 1000 veces (A). Tratamientos de 5000 y 2500 µg/mL (B y C respectivamente).	72

Figura 25: Evaluación de la actividad antimicrobiana de las fracciones 1-5 vs <i>S. aureus</i> (A) y <i>E. coli</i> (B).	74
Figura 26: SDS PAGE 2D de la fracción 5.	75

RESUMEN

Antecedentes: La miel es un producto natural producido por las abejas obreras a partir de néctar de flores y que dichas abejas combinan con sustancias endógenas específicas tales como sus proteínas. Este producto de la colmena es muy bien conocido por sus diferentes propiedades, tales como su actividad antimicrobiana y antioxidante. Diferentes autores mencionan que la actividad antimicrobiana de la miel está dada principalmente por el peróxido de hidrogeno y su alta osmolaridad; y que la actividad antioxidante está dada por los compuestos fenólicos. La miel está compuesta principalmente por azúcar, así como otros pequeños constituyentes como lo son: vitaminas, minerales poli fenoles, aminoácidos y proteínas; los cuales, podrían tener o ayudar a las actividades previamente mencionadas. Debido a esto, el objetivo del presente estudio es el de determinar el potencial antimicrobiano y antioxidante de las proteínas de la miel así como elucidar su proteoma y su contribución con las propiedades biológicas previamente mencionadas de la miel regional de *Apis mellifera*.

Métodos: La miel de *Apis mellifera* fue colectada en un apiario localizado en Yucatán, México. Las cepas utilizadas fueron *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* 25923. El extracto proteico obtenido por la metodología según Schmitzová (1998) fue fraccionado por cromatografía por afinidad (Concanavalina A Sepharose® 4B). La actividad antibacteriana del extracto crudo proteico (ECPMA) y de sus fracciones (F1-F5) fue desarrollado por el método de difusión n en disco y las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) fueron realizadas utilizando la metodología propuesta por la CLSI. La actividad antioxidante del ECPMA y sus fracciones fueron desarrolladas

por las metodologías DPPH, poder reductor de hierro y la capacidad quelante de cobre. Las proteínas fueron analizadas electroforéticamente por SDS-PAGE, SDS-PAGE 2D y Zimograma.

Resultados: El extracto crudo proteico (1 mg) de *Apis mellifera* mostró actividad antimicrobiana contra las bacterias analizadas, con halos de inhibición de 19 mm (*E. coli*) y 27 mm (*S. aureus*). La CMI del ECPMA fue de 2243 $\mu\text{g} / \text{mL}$ para *E. coli* y de 932.3 $\mu\text{g} / \text{mL}$ para *S. aureus*. Por otra parte, se obtuvieron 5 fracciones del ECPMA por cromatografía por afinidad (F1-F5). La F1 presentó proteínas no glicosiladas y mediante el método electroforético en gel-sustrato mostró que esta fracción contiene al menos una proteasa. La F5 (proteínas glicosiladas) mostró una ligera actividad antimicrobiana contra las bacterias evaluadas. El ECPMA y las fracciones 1, 2, 3 y 5 mostraron capacidad antioxidante mediante el ensayo DPPH, asimismo el ECPMA y las fracciones 1-5 mostraron actividad antioxidante mediante el ensayo de poder reductor de hierro. Por otra parte, el ECPMA no mostró actividad quelante. El análisis de los datos obtenidos por la secuenciación mostró que las proteínas que podrían estar presentes en la miel regional son las MRJP1, 2, 3, 5 y 6, así como las enzimas glucosa deshidrogenasa, glucosa oxidasa y proteasas.

Conclusiones: Las proteínas de miel contribuyen y tienen una correlación directa con la actividad antibacteriana y antioxidante de la miel. Estas proteínas poseen actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Las proteínas de miel de Yucatán mostraron ser mejores antioxidantes en comparación a las proteínas de las mieles de Malasia. Las proteínas que podrían estar presentes

en la miel regional de *Apis mellifera* son las MRJP1, 2, 3, 5 y 6, glucosa deshidrogenasa, glucosa oxidasa y proteasas.

ABSTRACT

Background: Honey is the product processed by honeybees from plant secretions, flower nectars and their own proteins. This natural product is well known for its different biological properties such as the antimicrobial and antioxidant activity. The broad spectrum of honey's antibacterial activity is thought to be principally because of Hydrogen peroxide and its high osmolality and the honey antioxidant activity is thought to be principally because of phenolic compounds. Honey consist principally of sugar and other minor compounds: vitamins, minerals, phenolic compounds, amino acids and proteins, which could have or help with the properties previously commented. Because of it, the aim of this study was to determine the antibacterial and antioxidant potential of honey proteins as well as to elucidate its proteome (until now unknown) and their contribution to the biological properties of the regional honey of *Apis mellifera*.

Methods: Honey samples (*Apis mellifera*) were collected from hives in the state of Yucatan, Mexico. Strains used were *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* 25923. The protein extraction was performed according to Schmitzová (1998) with slight modifications. Protein extract was purified by affinity chromatography (Concanavalin A-Sepharose® 4B). The antibacterial effect of protein crude extract (PCE) and protein fractions (F1-F5) was tested by disk diffusion method, MICs were determined using CLSI microdilution method. The antioxidant activity of PCE and proteins fractions was performed by DPPH assay, ferric antioxidant assay and cuprum antioxidant capacity. Finally, proteins were electrophoretically analyzed by SDS-PAGE, SDS-PAGE 2D and zymogram.

Results: Protein crude extract (1 mg) of *Apis mellifera* showed antimicrobial activity against both bacteria tested, with inhibition halos of 19 mm (*E. coli*) and 27 mm (*S. aureus*). The MICs of PCE were of 2243 µg/mL for *E.coli* and 932.3 µg/mL for *S. aureus*. Five fractions were obtained by affinity chromatography from the PCE (F1-F5). F1 presented non-glycosylated proteins and showed contain a protease by substrate-gel electrophoresis method. F5 (glycosylated proteins) showed barely antimicrobial activity against both bacteria tested. The PCE and fractions 1, 2, 3 and 5 showed antioxidant capacity by DPPH assay, likewise PCE and fractions 1-5 showed antioxidant activity by ferric antioxidant assay. Moreover PCE did not showed chelating activity by cuprum antioxidant capacity. The mass sequencing data analysis showed that the proteins that could be present in the regional honey are MRJP1, 2, 3, 5 y 6, as well as the enzymes glucose dehydrogenase, glucose oxidase and proteases.

Conclusions: Honey proteins contribute and have a direct correlation with the total honey antibacterial and antioxidant activity. These proteins have antimicrobial activity against Gram positive and Gram negative bacteria. Honey proteins showed to be better antioxidants than Malaysia honey proteins. The proteins that could be present in the regional honey of *Apis mellifera* are MRJP1, 2, 3, 5 y 6, as well as the enzymes glucose dehydrogenase, glucose oxidase and proteases.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas y neurodegenerativas se han ligado al estrés oxidativo, y en la actualidad ya representan un problema para el sector salud a nivel mundial. Enfermedades como el cáncer, el Alzheimer, el mal de Parkinson, la diabetes, la arteriosclerosis, el envejecimiento prematuro y problemas cardiovasculares causan anualmente miles de defunciones (Jiménez et al., 2011). Por otra parte, las enfermedades cardíacas, el cáncer, las enfermedades respiratorias y la diabetes son las principales causas de muerte en el mundo; de las 57 millones de muertes que tuvieron lugar a nivel mundial en el 2008, 36 millones, es decir el 63%, se debieron a estas enfermedades (Alwan et al., 2011). El estrés oxidativo es un desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas, que por consecuencia provocan daño oxidativo a las macromoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes (Ramos et al., 2006). Las células poseen antioxidantes de defensa que están formados tanto por elementos enzimáticos como no enzimáticos los cuales pueden actuar en sinergismo para proteger a la célula. De igual forma, se ha observado que ciertas proteínas son capaces de inhibir la oxidación lipídica por mecanismos específicos. Estas proteínas contribuyen a la capacidad antioxidante endógena obtenida mediante la dieta, también, se han utilizado como aditivos en alimentos debido a que pueden inhibir la oxidación lipídica a través de diferentes vías, tales como la inactivación de especies reactivas de oxígeno, estabilización de radicales libres, quelación de metales y reducción de hidroxiperoxidos (Elias et al., 2008). La ingesta

de alimentos de origen natural tales como las frutas, vegetales y semillas provee una fuente rica en antioxidantes, vitaminas y otros fitoquímicos con estas características, los cuales son de suma importancia como fuentes exógenas de compuestos capaces de ayudar a la célula a contrarrestar el estrés oxidativo (Lindsay & Astley, 2002). De igual manera, un problema y un reto hoy en día para la medicina moderna es la resistencia que han adquirido diversas bacterias a los antibióticos de uso común, esto debido al uso indiscriminado que se les ha dado. Las bacterias, por su tremenda capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos. La miel es una sustancia dulce, que es producida por las abejas obreras a partir de néctar de flores o de exudaciones de otras partes vivas de las mismas, y que dichas abejas obtienen, transforman y combinan con sustancias endógenas específicas (Grandjean & O campo, 2002). La miel es muy bien conocida por sus múltiples propiedades, tales como su capacidad antioxidante, como tratamiento para múltiples afecciones como las úlceras, gastritis, diarrea, enfermedades de origen bacteriano, entre otras (NHB, 2016). Diversos autores le atribuyen estas propiedades principalmente al pH, al peróxido de Hidrogeno, a la Osmolaridad, y a los compuestos fenólicos, dejando de lado a los compuestos de origen proteico, los cuales, actualmente son muy bien conocidos por jugar un rol importante en el mantenimiento fisiológico óptimo en múltiples organismos.

En la actualidad se conoce muy poco sobre el proteoma de la miel debido a la poca concentración de proteína presente en este producto. Se sabe que la miel puede

albergar a las proteínas: α , β - glucosidasas, amilasas, glucosa oxidasas, catalasas, proteasas y MRJPs; además del péptido antimicrobiano Defensina-1.

Por lo mencionado anteriormente, el presente estudio tiene como objetivo caracterizar el proteoma de la miel de *A. mellifera* así como evaluar su capacidad antioxidante y antimicrobiana, con la finalidad de encontrar nuevos compuestos de origen natural que puedan fungir como tratamiento preventivo ó coadyuvante a enfermedades y/o como alternativa a los antibióticos comúnmente utilizados.

CAPITULO II

FUNDAMENTO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

2.1 ESTRÉS OXIDATIVO

Las enfermedades crónicas y neurodegenerativas se han ligado al estrés oxidativo, y en la actualidad ya representan un problema para el sector salud a nivel mundial. Enfermedades como el cáncer, el Alzheimer, el mal de Parkinson, la diabetes, la arteriosclerosis, el envejecimiento prematuro y problemas cardiovasculares causan anualmente miles de defunciones (Jiménez et al., 2011). Por otra parte, las enfermedades cardíacas, el cáncer, las enfermedades respiratorias y la diabetes son las principales causas de muerte en el mundo; de las 57 millones de muertes que tuvieron lugar a nivel mundial en el 2008, 36 millones, es decir el 63% se debieron a estas enfermedades. Con el aumento del impacto de estos padecimientos y el envejecimiento de la población, se prevé que el número de muertes en el mundo seguirá creciendo cada año, y que el mayor crecimiento se producirá en regiones de ingresos bajos y medios (Alwan et al., 2011). Por otra parte, en México aproximadamente el 75% de las muertes son causadas por enfermedades crónico-degenerativas. (Gershenson & Wisdom, 2013).

Ramos y colaboradores (2006) en su comunicado definen al estrés oxidativo como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas (ER), que por consecuencia provocan daño oxidativo a las macromoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes

de defensa. Este daño se relaciona con el envejecimiento y con más de 100 padecimientos. El daño celular que producen las especies reactivas se da en los enlaces de proteínas, los fosfolípidos poliinsaturados de las membranas celulares, carbohidratos y en los ácidos nucleicos, lo que provoca gran variedad de cambios bioquímicos y fisiológicos en la célula.

Por otra parte, Corrales y Muñoz (2012) indicaron en su revisión que el término especies reactivas hace alusión a dos tipos de moléculas: los radicales libres y los no radicales. Estas moléculas pueden formarse como resultado del metabolismo celular y se encuentran representados dentro de los sistemas biológicos por las especies reactivas de oxígeno (ROS) y por las especies reactivas de nitrógeno (RNS) las cuales se pueden originar tanto en procesos fisiológicos normales como en procesos patológicos. Por otra parte, se pueden incluir a otras especies reactivas (no muy comunes) provenientes de otros elementos tal y como el cloro (RCIS) y bromo (RBrS).

2.1.1 Radicales libres

Corrales y Muñoz (2012) mencionan que los radicales libres son moléculas que en su última orbita contienen uno o más electrones desapareados lo cual le otorga una propiedad paramagnética que las torna muy inestables y altamente reactivas lo cual le brinda la capacidad de reaccionar inespecíficamente con diferentes macromoléculas y sus derivados en las células. Los radicales libres son formados a través de diferentes procesos metabólicos aeróbicos esenciales del organismo,

razón por la cual son considerados especies químicas naturales, ya que de modo continuo son generadas por los seres vivos. Estas moléculas, al no tener una configuración electrónica óptima buscan su estabilidad. Esto lo hacen al interactuar con otras moléculas mediante reacciones de óxido reducción. En esta reacción ocurre una transferencia de electrones que implican la reducción y la oxidación de las moléculas participantes. Estas reacciones provocan una reacción en cadena que como consecuencia provoca la producción de nuevos radicales libres. Dicha reacción en cadena solo se detendrá cuando dos radicales libres se encuentren y reaccionen entre sí.

2.1.1.1 Clasificación de los radicales libres

Los radicales libres se han clasificado en función al grupo funcional que posee la molécula, como por ejemplo, el bromo, nitrógeno, sulfuro, fósforo, oxígeno, cloro, entre otros. Los radicales libres de oxígeno son los que se encuentran con mucho más frecuencia debido a la participación en los diferentes procesos aeróbicos. Por otra parte, se ha comprobado mediante diversas investigaciones que estos radicales están implicados en numerosas patologías como lo son la trombosis, hipertrofia, Parkinson, demencia, artritis reumatoide, pancreatitis, hepatotoxicidad, cataratas, inflamación, intoxicaciones, envejecimiento, cáncer, aterosclerosis, anemia, asma, soriasis, entre otras.

2.1.1.2 Fuentes de radicales libres

Endógenas

Mitocondria: es considerada como la principal fuente de radicales libres debido a que ahí se produce el metabolismo oxidativo. Se considera que en este organelo se consume del 95 al 98% del oxígeno total presente en la célula. Se estima que cada mitocondria produce alrededor de 10^{-7} M RL/día.

Peroxisomas: estos organelos contienen una gran cantidad de enzimas que producen H_2O_2 y enzimas que actúan en el metabolismo del ácido glioxílico, de bases purinicas y de aminoácidos. Estos organelos contienen altas concentraciones de la enzima catalasa, que convierten al H_2O_2 en H_2O y O_2 . Un cambio en el balance, en donde el H_2O_2 no es dismutado por el sistema peroxisomal inevitablemente produce daño celular.

Fagocitosis: durante esta etapa se producen especies reactivas de oxígeno benéficas, ya que está es la primera fase en la defensa contra patógenos. Las células fagocíticas se activan al percibir la presencia de productos bacterianos, víricos o de parásitos desencadenando una producción de radicales, tales como O_2 , H_2O_2 , OH^\cdot y NO^\cdot para destruir las células afectadas. Las células fagocíticas poseen en sus membranas la enzima NADPH oxidasa que genera O_2^\cdot , la cual en presencia de iones Fe^{2+} pasa a ser OH^\cdot .

Fuentes exógenas

Existen otras fuentes o factores que favorecen a la formación de los radicales libres tales como la exposición a rayos ultravioleta, X o Gamma; por el consumo de tabaco; a contaminantes del aire; al consumo de ácidos grasos poliinsaturados; al consumo de ciertos medicamentos, entre otros (Corrales y Muñoz, 2012).

2.1.2 Antioxidantes

Sustancias que retardan o previenen la oxidación de biomoléculas como lo pueden ser los lípidos, proteínas, ADN, o cualquier otro tipo de molécula con propiedad oxidable.

Como resultado de la inherente reactividad y el daño que pueden causar las ERO y ERN varios antioxidantes de defensa se encuentran en las células aeróbicas. Estos antioxidantes varían dependiendo del tipo de organelo (figura 1) y se encargan de mantener el balance normal redox en las células. Estas moléculas previenen, interceptan o pueden reparan los daños ocasionados por las especies reactivas (Lindsay & Astley, 2002).

Los organismos poseen antioxidantes de defensa que están formados tanto por elementos enzimáticos como no enzimáticos, los cuales pueden actuar en sinergismo para proteger a la célula. En primera instancia, para la defensa celular participan los componentes de origen enzimático. Estas moléculas se encargan de evitar la acumulación de especies reactivas de oxígeno, tales como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno.

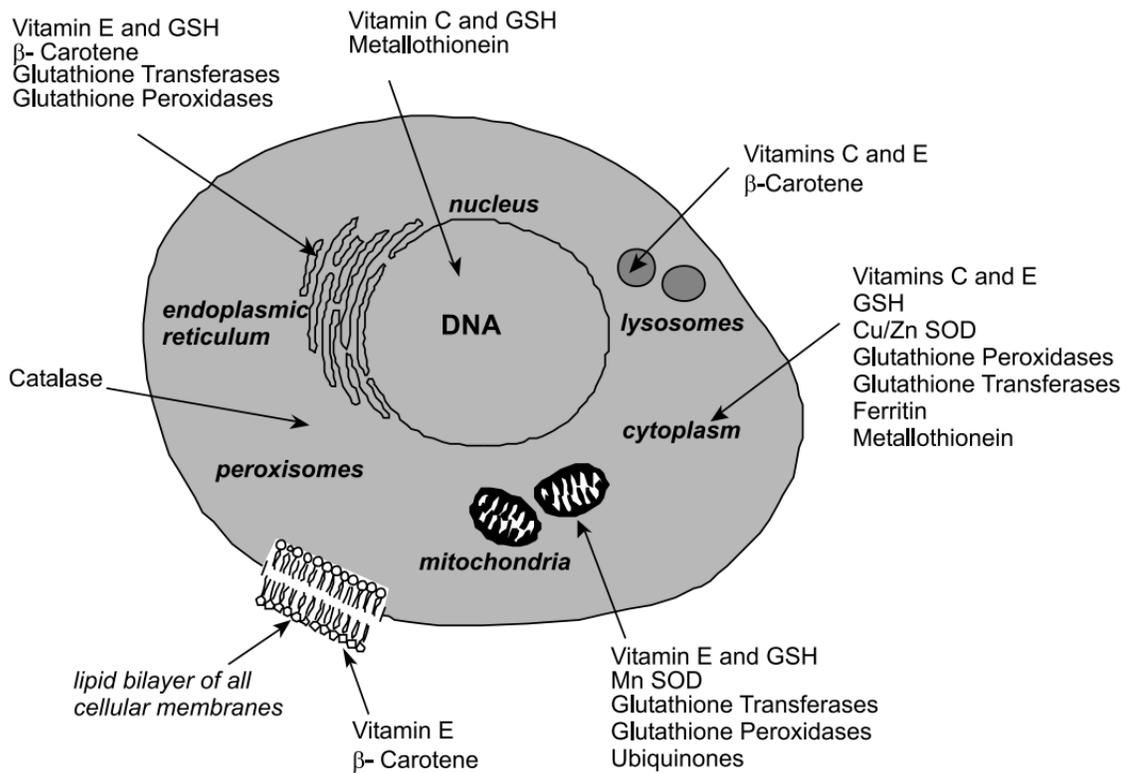


Figura 1: Sistema de defensa antioxidante en la célula (Lindsay & Astley, 2002)

2.1.2.1 Sistemas de defensa antioxidante de origen enzimático

Superoxido Dismutasa (SOD): esta proteína se encarga de catalizar la dismutación del radical libre O_2^- a H_2O_2 el cual es menos reactivo y puede ser degradado por otras enzimas como la catalasa.

Catalasa: es una enzima que se encuentra normalmente en los peroxisomas y mitocondrias. Esta proteína se encarga de catalizar la descomposición de H_2O_2 en H_2O y O_2 .

Glutación peroxidasa: es una enzima que en presencia de glutación en estado reducido (GSH) cataliza la reducción del peróxido de hidrogeno y otros hidroperóxidos orgánicos en agua y alcohol, respectivamente (Corrales y Muñoz, 2012).

Glutación reductasa: Enzima que cataliza la reducción del glutación (GSH) oxidado. La glutación reductasa es esencial para el ciclo redox del glutación, manteniendo niveles adecuados dentro de las células de este antioxidante de origen natural (Dolphin et al, 1989).

2.1.2.2 Antioxidantes no enzimáticos provenientes de fuentes naturales

La ingesta de frutas, vegetales y semillas provee una fuente rica de antioxidantes, vitaminas y otros fitoquímicos con características antioxidantes, los cuales son de suma importancia como fuentes exógenas de compuestos capaces de ayudar a la célula contra el estrés oxidativo (Lindsay & Astley, 2002).

Algunas de las moléculas que podemos obtener por la dieta es la vitamina C (ácido ascórbico, figura 2) el cual es un antioxidante soluble en agua que tiene un alto poder antioxidante y se encuentra tanto a nivel extracelular como intracelular en la forma de ascorbato y actúa directamente sobre los radicales superóxido, hidroxilo y algunos hidroperóxidos lipídicos, además de actuar sobre el tecoferoxilo, transformándolo a vitamina E (Corrales y Muñoz, 2012).

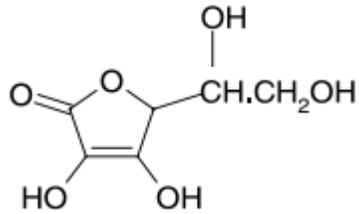


Figura 2: Estructura del ácido ascórbico

La vitamina E (α -tocoferol, figura 3) es un término genérico para una serie de moléculas naturales llamadas tocoferoles y tocotrienoles. La vitamina E es generalmente aceptada como el antioxidante primario de origen lipídico en el humano (Lindsay & Astley, 2002).

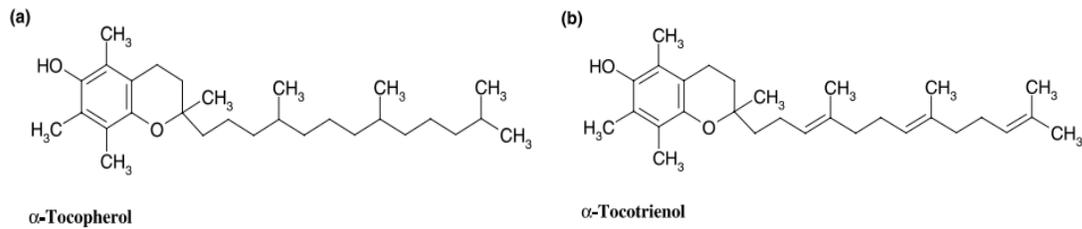


Figura 3: Estructura del α -tocoferol (a) y α -tocotrienol (b)

En la dieta promedio se pueden consumir al menos 60 carotenoides de diferentes frutas y vegetales. Los principales carotenoides que se pueden obtener son el α y β caroteno, β criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina (figura 4).

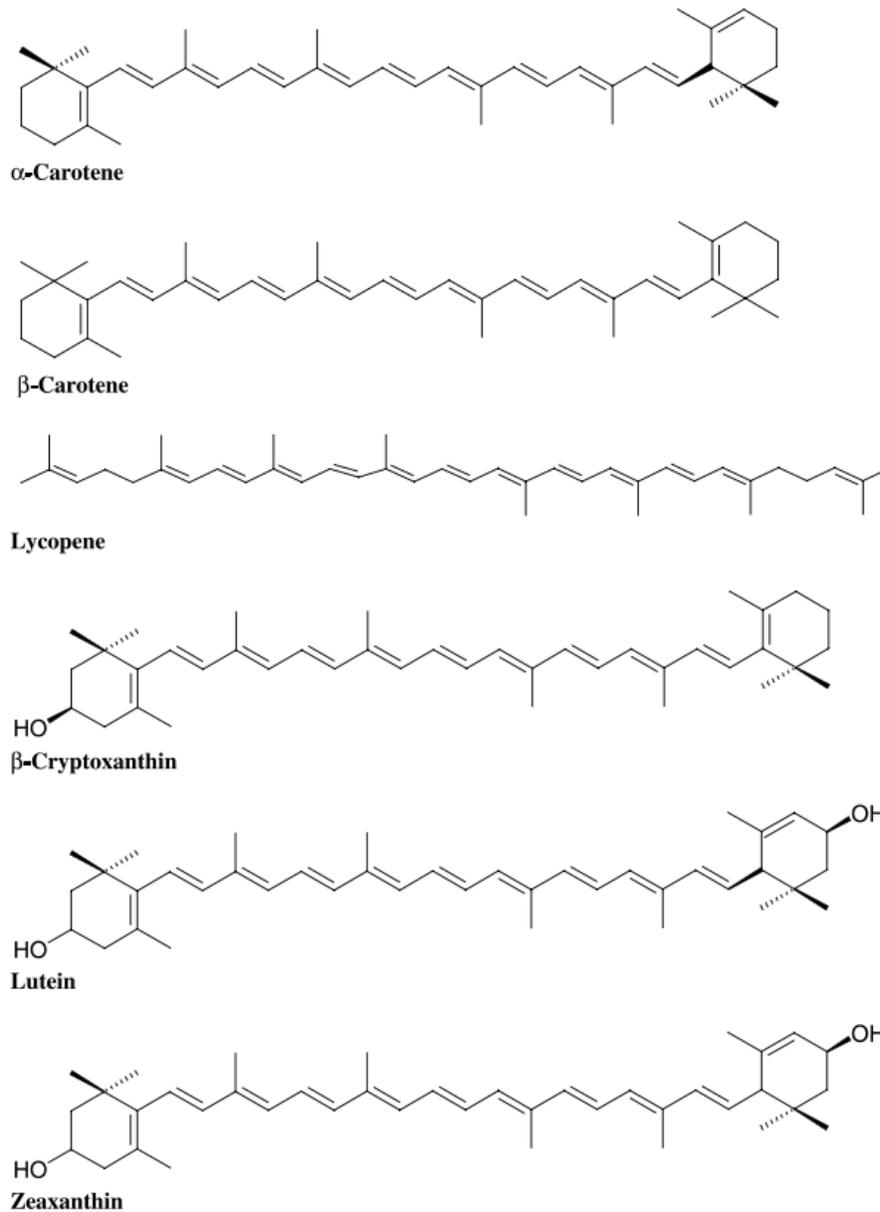


Figura 4: Estructura de los carotenoides comúnmente encontrados en la dieta

Los compuestos fenólicos son muy comunes dentro del reino plantae. Existe una gran variedad de compuestos fenólicos en plantas, tales como el ácido cinámico, derivados de ácido benzoico, flavonoides, proantocianidinas, lignanos y ligninas. La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos está en función de sus grupos

hidroxilos (figura 5), el cual les da la propiedad de donar de átomos de Hidrogeno (Lindsay & Astley, 2002).

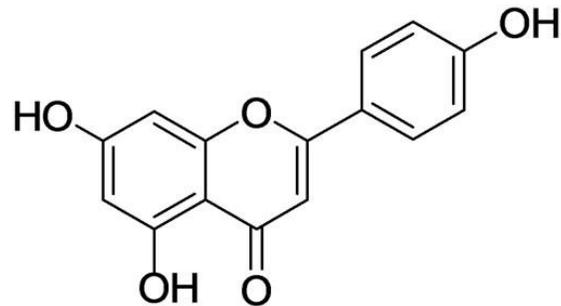


Figura 5: Estructura de la apigenina

El glutatión es una molécula formada por 3 aminoácidos (tripéptido, figura 6) que presenta una distribución tisular variable. Esta molécula es el compuesto tiólico de bajo peso molecular más abundante en las células mamíferas y su obtención no está dada principalmente por la dieta. Este tripéptido actúa sobre el peróxido de hidrogeno, radical hidroxilo y el superóxido (Corrales y Muñoz, 2012).

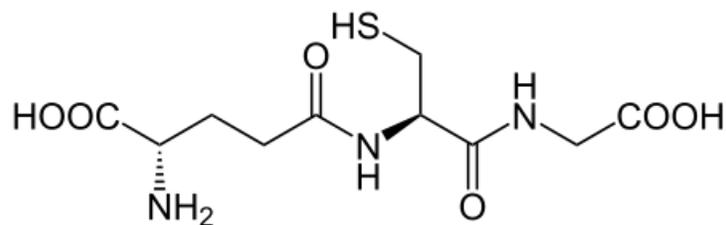


Figura 6: Glutatión

2.1.2.3 Estado redox a nivel celular

Un mecanismo crítico para el control de la homeostasis celular es el mantenimiento del estado redox. Esto es determinado por la afinidad de acarreadores específicos de electrones y varían en función del organelo. Cualquier alteración en el estado redox puede desencadenar una serie de señales tales como para la transcripción, traducción y modificaciones postraduccionales. Enzimas sensibles a cambios en el estado de redox han mostrado un rol importante en la diferenciación, en la edad y en el envejecimiento (Chen et al., 1995; Lindsay & Astley, 2002).

Proteínas extracelulares o las presentes en la superficie celular normalmente son ricas en puentes disulfuro. Por otro lado, el estado intracelular esta usualmente reducido y las proteínas presentes poseen sus grupos sulfhidrilos libres. El rol importante que juegan los grupos tiol en las proteínas celulares puede ser influenciado por la oxidación por óxido nítrico y el radical de oxígeno para formar productos tales como R-S-NO. Otra modificación está dada por la producción de puentes disulfuro intermoleculares (-S-S-) y puentes disulfuro heterogéneos (-S-SR) (Stamler & Hausladen, 1998; Lindsay & Astley, 2002).

2.1.2.4 Proteínas antioxidantes

Se ha observado que ciertas proteínas son capaces de inhibir la oxidación lipídica por mecanismos específicos. Estas proteínas contribuyen a la capacidad antioxidante endógena obtenida mediante la dieta. Por otra parte, se han utilizado a estas macromoléculas como aditivos en alimentos debido a que pueden inhibir la

oxidación lipídica a través de diferentes vías, tales como la inactivación de especies reactivas de oxígeno, estabilización de radicales libres, quelación de metales y reducción de hidroxiperóxidos. El incremento de la actividad antioxidante de una proteína puede estar dada por el desdoblamiento de su estructura terciaria, esto promueve a que diversos aminoácidos con propiedad antioxidante queden libres para interacciones con el medio (Elias et al., 2008).

La susceptibilidad oxidativa que poseen algunos residuos aminoácidos al ataque de los radicales libres está en función de su grupo R; sin embargo, la accesibilidad al medio y las propiedades químicas de los residuos vecinales juegan un papel importante. A pesar de que los 20 aminoácidos son potencialmente oxidables, existen aminoácidos más reactivos que otros, como por ejemplo los azufrados con cadenas nucleófilas (cisteína y metionina) o los que poseen cadenas aromáticas (fenilalanina, tirosina y triptófano) las cuales pueden donar un átomo de Hidrogeno. Incluso la histidina con su grupo funcional imidazol puede actuar como antioxidante (Tabla 1) (Elias et al., 2008).

Tabla 1: Productos generados como resultado de la oxidación de ciertos aminoácidos y sus mecanismos de formación (Davies & Dean, 1997; Elias et al., 2008).

AMINOÁCIDO	PRODUCTO	MECANISMO DE FORMACIÓN
Cisteína (Cys)	(1) Cistina (2) Oxiácidos	(1) Sustracción del H del grupo SH y subsecuente dimerización. (2) Sustracción del H del grupo SH y reacción con O.

Metionina (Met)	Sulfóxido de Metionina	Variedad de rutas incluyendo reacción con radicales y no radicales.
Triptófano (Trp)	(1) N-formil quinurenina (2) Quinurenina (3) 5 y 7- hidroxitriptofano	Reacción con OH u oxidación de un electrón del anillo.
Tirosina (Tyr)	(1) 3,4-hidroxi- fenilalanina (2) Di-tirosina (3) 3-clorotirosina	(1) Reacción con OH u oxidación de un electrón del anillo. (2) Reacción con OH u oxidación de un electrón y posterior dimerización. (3) Cloración de tirosina (HOCl).
Fenilalanina (Phe)	(1) o-,m-tirosina (2) Dímeros aromáticos hidroxilados	(1) Reacción con OH u oxidación de un electrón del anillo. (2) Reacción con OH u oxidación de un electrón y posterior dimerización.
Histidina (His)	2-oxo-histidina	Reacción con OH u oxidación de un electrón

2.1.2.4.1 Proteínas antioxidantes provenientes de fuentes naturales

En la actualidad existen reportes en los cuales mencionan que proteínas provenientes de fuentes naturales poseen capacidad antioxidante. Rubio (2015) llego a la conclusión que los tres extractos proteicos obtenidos del fruto de la piñuela (*Bromelia karatas*): el extracto crudo, extracto soluble y el extracto membranal, presentaron actividad de captación de radicales libres como DPPH y ABTS+, poder reductor y de quelación de iones metálicos. Por otra parte, los tres extractos mostraron poseer capacidad reductora (donación de electrones o de átomos de hidrógeno).

2.2 MICROORGANISMOS RESISTENTES A LOS ANTIBIÓTICOS

Un problema y un reto hoy en día para la medicina moderna es la resistencia que han adquirido diversas bacterias a los antibióticos de uso común debido al uso indiscriminado que se les ha dado.

Las bacterias, por su tremenda capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos. Existe una resistencia natural o intrínseca en las bacterias si carecen de diana para un antibiótico. La resistencia adquirida es realmente importante desde un punto de vista clínico: la cual es debida a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética

Los mecanismos de resistencia de las bacterias son fundamentalmente tres:

i) Inactivación del antibiótico por enzimas: La bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico; las más importantes son las betalactamasas y muchas bacterias son capaces de producirlas. En las gram positivos suelen ser plasmídicas, inducibles y extracelulares y en las gram negativas de origen plasmídico o por transposones, constitutivas y periplásmicas.

ii) Modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana: Las bacterias producen mutaciones en las porinas de la pared que impiden la entrada de ciertos antibióticos (betalactámicos) o alteran los sistemas de transporte (aminoglucósidos en los anaerobios). En otras ocasiones pueden provocar la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activa, impidiendo que se acumule en cantidad suficiente para que actúe eficazmente.

iii) Alteración por parte de la bacteria de su punto diana, impidiendo o dificultando la acción del antibiótico. Aquí podemos contemplar las alteraciones a nivel del ADN girasa (resistencia de quinolonas), del ARNr 23S (macrólidos) de las enzimas PBPs (proteínas fijadoras de penicilina) necesarias para la formación de la pared celular (resistencia a betalactámicos).

Una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos de diversas especies bacterianas, todo lo cual complica bastante el estudio de las resistencias de las bacterias a los distintos antimicrobianos (Daza, 1998).

2.3 MIEL

Se entiende como miel aquella sustancia dulce, que es producida por las abejas obreras a partir de néctar de flores o de exudaciones de otras partes vivas de las mismas, y que dichas abejas obtienen, transforman y combinan con sustancias endógenas específicas, que posteriormente, almacenan en paneles dentro de la colmena (Grandjean & O campo, 2002).

Desde tiempos ancestrales se ha sabido que la miel no únicamente funge como endulzante, si no que posee una amplia gama de propiedades, las cuales fueron aprovechadas y utilizadas en las civilizaciones antiguas para curar diferentes afecciones. En la actualidad, aproximadamente el 93% de las personas que consumen miel en sus hogares consideran a esta secreción como un producto saludable (NHB, 2016).

2.3.1 Afecciones clínicas que responden al tratamiento con miel

Úlceras, gastritis, diarrea

El uso de miel como tratamiento para las úlceras pépticas y gastritis se ha venido usando desde tiempos ancestrales como medicina tradicional, y esto en la actualidad, ha sido confirmado mediante varios reportes.

La gastroenteritis y diarrea infantil son usualmente tratadas con una solución de glucosa y electrolitos para la rehidratación. La glucosa facilita la absorción de electrolitos y la absorción del agua. Cuando la glucosa fue remplazada por miel al 5% (v/v) se observó que la duración de la diarrea en pacientes con gastroenteritis

fue más corta para infecciones bacterianas comparada con las soluciones utilizadas normalmente. Para los pacientes con diarrea viral los tiempos no fueron acortados lo cual resalta las propiedades antimicrobianas de la miel. Además de la actividad antimicrobiana, algunos compuestos de la miel pueden promover la reparación de la mucosa intestinal dañada, estimular el crecimiento de nuevo tejido y fungir como un agente antiinflamatorio.

Afecciones oftalmológicas

En la actualidad se han publicado diversos reportes en los cuales se detalla el uso de miel para tratar las inflamaciones de parpado (blefaritis), conjuntivitis, inflamaciones de córnea (queratitis), así como ciertos tipos de quemaduras en los ojos. Normalmente se ha utilizado a la miel como ungüento para los casos anteriormente mencionados (NHB, 2016).

Actividad antioxidante

La miel es conocida por contener diversas moléculas con capacidad antioxidante tales como los compuestos fenólicos. Los agentes antioxidantes juegan un papel importante combatiendo a los agentes oxidantes tales como el oxígeno y los radicales libres, los cuales pueden dañar a las macromoléculas presentes en las células u oxidando los alimentos. Estos antioxidantes pueden estar en forma de complejos enzimáticos, o en compuestos no enzimáticos (NHB, 2016).

La actividad antioxidante de la miel está dada principalmente por la vitamina C, monofenoles, polifenoles y flavonoides. Por otra parte, existen diversos compuestos que le brindan a la miel su actividad antioxidante, pero predominan el ácido cafeico, ácido cafeico fenil-éster, crisina, galangina, quercetina, acacetina, pinocembrina y apigenina. Estos compuestos antioxidantes prometen ser compuestos farmacológicos para la prevención de cáncer, enfermedades cardiovasculares, eventos inflamatorios, degeneración neurológica, cicatrización, enfermedades infecciosas y envejecimiento prematuro así como su utilización para la preservación de alimentos (Khalil et al., 2010).

2.3.2 Propiedades químicas y compuestos de la miel que brindan actividad antimicrobiana

Ortiz y colaboradores (2013) en su revisión mencionan las propiedades de la miel que brindan parte de su actividad antimicrobiana, las cuales se enlistan a continuación:

Osmolaridad: está como resultado de la gran concentración de azúcares dentro de esta secreción, y que es muy bien conocido que esta condición le brinda parte su potencial antimicrobiano a la miel.

Acidez: el pH ácido de la miel (3 – 3.5) está dado principalmente por presencia de ácidos orgánicos. Estos ácidos evitan el crecimiento de la mayoría de microorganismos, por consiguiente, se considera como un factor antimicrobiano. El

principal ácido orgánico presente en la miel es el ácido glucónico el cual es un producto de la reacción enzimática de la glucosa oxidasa.

Peróxido de hidrogeno: esta molécula es producto de la degradación de la glucosa por la enzima glucosa oxidasa. Por otra parte, muchos autores señalan al peróxido de hidrogeno como el principal autor de la actividad antimicrobiana de la miel, aunque en diversas investigaciones se ha demostrado que la miel posee otros compuestos además del peróxido de hidrogeno que tienen esta capacidad.

Enzimas y péptidos antimicrobianos: en la actualidad existen diversos reportes que hablan sobre compuestos de origen proteico que tienen capacidad antimicrobiana contra diferentes bacterias patógenas. La glucosa oxidasa es una enzima que degrada a la glucosa y está encargada de la producción de ácido glucónico y peróxido de hidrogeno. Otra enzima a la cual se le pueden atribuir propiedades antimicrobianas es la lisozima; esta proteína hidroliza los enlaces β 1-4 entre N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico pertenecientes al peptidoglicano que forma parte de las paredes bacterianas.

Las enzimas no son las únicas moléculas de origen proteico que poseen actividad en la miel, algunos artículos hablan sobre péptidos con capacidad antimicrobiana. La defensina 1 y la royalisina fueron identificadas en primera instancia en la hemolinfa, en la cabeza y en la sección toraxica de las abejas. La royalisina posee un amplio espectro en cuanto a su potencial antimicrobiano, actuando sobre *B. subtilis*, *S. aureus*, y *Paenibacillus larvae*. Destacando que la relación que existe entre la actividad antimicrobiana de la miel y de sus proteínas aún permanece incierto; por otra parte, algunos reportes mencionan que la cantidad de proteína en

la miel puede variar en función de la zona geográfica de la cual se obtenga, así como de su origen entomológico.

2.3.3 Proteínas de la miel

En la actualidad existen muy pocos estudios sobre las proteínas de la miel debido a la muy baja cantidad de estas macromoléculas (0.1-0.5%) dentro de este producto natural. De igual forma, debido a la alta cantidad de azúcares resulta complicada su extracción (Chua, Lee & Chan., 2013).

2.3.3.1 Enzimas

2.3.3.1.1 α – Amilasas (EC 3.2.1.1)

Es una endo-enzima que hidroliza enlaces dentro del polímero de almidón de forma aleatoria, permitiendo la generación de oligosacáridos lineales y ramificados. La mayoría de estas enzimas pertenecen a esta familia.

2.3.3.1.2 β – Amilasas (EC 3.2.1.2)

Es una exo-enzima que hidroliza los enlaces glucosídicos α 1-4 del almidón para liberar unidades de maltosa provenientes de la parte no reductora del azúcar.

2.3.3.1.3 α - Glucosidasa (EC 3.2.1.20)

Esta enzima actúa sobre los enlaces glucosídicos α 1-4 de los oligosacáridos liberando glucosa (Divakar, 2013).

2.3.3.1.4 Glucosa oxidasa (EC 1.1.3)

Estas enzimas se encuentran en el grupo de las oxirreductasas. Estas proteínas pueden utilizar al oxígeno como el último aceptor de electrones, liberando peróxido de hidrógeno y ácido glucónico (Ferri et al., 2011).

Won y colaboradores (2008) mencionan en su artículo que la miel posee proteínas en pequeñas cantidades y que varias enzimas son componentes importantes de este producto natural, tales como la α , β - glucosidasa, amilasas y glucosa oxidasa.

2.3.3.1.5 Catalasa (EC 1.11.1.6)

Esta proteína se encarga de catalizar la descomposición de H_2O_2 en H_2O y O_2 .

Los autores Schepartz y Subers (1996) fueron de los primeros en demostrar la existencia de esta enzima dentro de la miel.

2.3.3.1.6 Proteasas (3.4.X.X)

El término proteasa incluye a todas las proteínas que hidrolizan enlaces peptídicos. Las proteasas, a su vez están divididas en *exopeptidasas*, enzimas que hidrolizan

enlaces peptídicos en los enlaces amino y carboxilo terminales, y *endopeptidasas*, las cuales hidrolizan enlaces peptídicos internos en un polipéptido. En un principio, las proteasas fueron clasificadas de acuerdo a su masa molecular, carga o por la especificidad de su sustrato. Un nuevo sistema más racional ahora las clasifica en función de sus sitios activos, mecanismos de acción y de su estructura tridimensional. Cuatro clases de mecanismos están reconocidos por la Unión Internacional de Bioquímica, (i) Proteasa serina; (ii) proteasa aspartica; (iii) proteasas cisteína y (iv) metaloproteasas (Beynon & Bond, 1989).

Rossano y colaboradores (2012) reportaron la presencia de proteasas de tipo serina en mieles del sur de Italia. Estos autores utilizaron diferentes inhibidores enzimáticos para llegar a esa conclusión.

2.3.3.2 Proteínas de origen no enzimático

2.3.3.2.1 MRJPs

Las glicoproteínas MRJPs (Major Royal Jelly Proteins) fueron descubiertas en primera instancia en la jalea real. La primera proteína descubierta en la jalea real también fue la proteína más abundante y fue nombrada major royal jelly protein 1 (MRJP1). Siguiendo esta misma terminología, las nueve proteínas más abundantes en la jalea real fueron también denominadas MRJPs (MRJPs 1-9). Estas proteínas son sintetizadas con una péptida señal N-terminal que consiste de 16 a 20 aminoácidos, y por lo tanto están destinadas a ser proteínas de secreción. Las

MRJPs maduras poseen de 400 a 578 aminoácidos y tienen un peso molecular que comprende de 45 a 68 kDa.

Por otra parte, se ha observado que algunas MRJPs son moduladas en presencia de bacterias, tal y como la MRJP3 y la MRJP4 que aumentan y disminuyen su concentración respectivamente en la cabeza de las abejas después de 8 horas de infección con *Escherichia coli* (Buttstedt et al., 2013).

Uno de los autores que ha reportado la presencia de estas proteínas en la miel es Di Girolamo y colaboradores (2012) los cuales identificaron a 5 proteínas pertenecientes a la familia MRJPs (1-5).

2.3.3.2 Defensina – 1

Péptido antimicrobiano también conocido como Royalisina. Fue descubierto en primera instancia por Fujiwara y colaboradores (1990) en la jalea real. Es un péptido antimicrobiano que consiste de 51 a.a. con una masa calculada de 5523 Da.

Di Girolamo y colaboradores (2012) reportaron la presencia de este péptido antimicrobiano en mieles provenientes de Italia.

2.3.3.3 Proteoma de la miel

En la actualidad solo dos autores con sus respectivos grupos de trabajo han podido elucidar el proteoma de mieles endémicas Italia, uno de ellos es Di Girolamo y colaboradores (2012), los cuales identificaron el proteoma de cinco mieles

monoflorales procedentes de Italia (castaña, girasol, acacia, eucalipto y naranjo). Estos autores identificaron ocho proteínas de las cuales siete se encontraron en todas las mieles. Cinco pertenecieron a la familia MRJP (MRJP1-MRJP5) y fueron las más abundantes; también se encontró a la enzima α -glucosidasa y a la defensina-1. Por otra parte, también se localizó a la proteína de origen vegetal gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. Esta enzima únicamente se encontró en la miel de acacia y a muy baja concentración.

Por otra parte Rossano y colaboradores (2012) elucidaron el proteoma de mieles uniflorales (naranjo, castaña, eucalipto y zulla) provenientes del sur de Italia. Estos autores encontraron a las proteínas MRJP1-5, a las enzimas α – glucosidasa, glucosa oxidasa y súper oxido dismutasa y a la proteína apimisina.

Se puede observar que ambos autores encontraron como constituyentes principales de las mieles de Italia evaluadas a las proteínas MRJP1-5 y a la enzima α – glucosidasa. Con estas investigaciones y con la caracterización proteica se podrían establecer parámetros de discriminación para las mieles provenientes de diferentes regiones.

2.3.3.4 Actividad antioxidante de proteínas de la miel

Chua y colaboradores (2015) en su investigación demostraron que las proteínas de la miel poseen actividad antioxidante; para ello, utilizaron los ensayos de captación de radicales libres (DPPH) y el ensayo de poder antioxidante férrico reductor. Estos autores señalan que el poder reductor fue mayor que el poder de captación para

todos los extractos proteicos de la miel. Esto muestra que las proteínas de la miel actúan principalmente como un agente reductor. Previamente estos autores identificaron que en el extracto proteico de las mieles se localizaban las proteínas MRJP1, MRJP2, MRJP5 y MRJP7 así como unas proteínas no conocidas.

Por otra parte, Nagai & Inoue (2004) en su estudio hablan sobre la actividad antioxidante que poseen los extractos acuosos y alcalinos obtenidos de la jalea real. Estos extractos estaban compuestos principalmente por proteínas, por lo que estos autores responsabilizaron a estas macromoléculas como las principales encargadas de brindarle la capacidad antioxidante. Cabe mencionar que casi el 80% del contenido total proteico en la jalea real está compuesto por las MRJPs.

2.3.3.5 Proteínas de la miel como precursoras para la actividad antimicrobiana

Brudzynski y Sjaarda (2015) en su artículo mencionan que la miel posee glicoproteínas capaces de actuar como precursores y por ende inhibir y/o eliminar el crecimiento de dos bacterias (una Gram positiva y una Gram negativa), y que además, estas glicoproteínas tienen la capacidad de lisar la pared celular en estos microorganismos. Estos autores mediante una serie de técnicas identificaron a una glicoproteína de 61 kDa como la MRJP1 (Major Royal Jelly protein 1) que es precursora de unos péptidos que poseen actividad antimicrobiana, las jelleinas. Estos péptidos pueden ser los encargados de la lisis celular y no la MRJP1 en sí. Estos investigadores concluyeron que la MRJP1 actúa como fuente para la

producción de jelleinas y que funge en la miel como una proteína antimicrobiana, formando parte de la acción bactericida en esta secreción.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, las enfermedades crónicas y neurodegenerativas se han ligado al estrés oxidativo y representan un problema para el sector salud a nivel mundial. Enfermedades como el cáncer, el Alzheimer, el mal de Parkinson, la diabetes, el envejecimiento prematuro y problemas cardiovasculares causan anualmente miles de defunciones. Por otra parte, otro problema y no menos importante es la resistencia que han adquirido diversas bacterias patógenas a los antibióticos de uso común debido a su uso indiscriminado. Esto ha propiciado la búsqueda de nuevos compuestos provenientes de fuentes naturales que puedan fungir como alternativa a estas problemáticas. En el mismo contexto, se ha observado que las proteínas y sus derivados han adquirido un valor importante hoy en día debido a que pueden fungir como antibióticos y como antioxidantes. La miel, es una secreción de las abejas a la cual se le han atribuido diversas propiedades que ayudan a la salud humana. Esta secreción cuenta con diferentes compuestos, tales como las proteínas, que le pueden brindar parte de sus propiedades características, tales como su capacidad antioxidante, actividad antimicrobiana, entre otras.

HIPÓTESIS

Las proteínas de la miel de *Apis mellifera* poseen actividad antioxidante y antimicrobiana contra *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923.

OBJETIVOS

Objetivo general

- ▶ Caracterizar las proteínas presentes en la miel de *Apis mellifera* y evaluar su actividad antioxidante y antimicrobiana.

Objetivos específicos

- Evaluar la separación de las proteínas de la miel por cromatografía de afinidad.
- Analizar e identificar las proteínas de la miel por técnicas electroforéticas desnaturizantes (SDS-PAGE, SDS-PAGE 2D) y no desnaturizantes (Zimograma).
- Evaluar la capacidad antioxidante del extracto crudo proteico de la miel y sus fracciones.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto crudo de la miel y sus fracciones contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

La miel de *Apis mellifera* fue obtenida de un apiario localizado en el municipio de Mérida, Yucatán. Posterior a la recolección, la miel fue guardada a temperatura ambiente hasta su posterior uso. Las cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo fueron *Escherichia coli* ATCC (American Type Culture Collection) 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

3.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LA MIEL

Las miel de *Apis* fue disuelta y homogenizada en buffer de fosfatos (50 mM NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 , pH7, 10 mM NaCl) a una concentración final de 100 mg/mL, esto fue durante 30 minutos en hielo con intervalos de agitación de 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 5,000 g por 40 minutos a 4°C. Posteriormente se recuperó el sobrenadante al cual se le denominó extracto crudo proteico de miel *Apis* (ECPMA). Seguidamente, los extractos fueron concentrados mediante columnas Amicon® ultra - 15 (3K). Una vez finalizado este procedimiento se dividió en alícuotas de 2 mL y se guardó a -20°C hasta su posterior análisis (Schmitzova et al., 1998 modificado).

3.3 CUANTIFICACIÓN PROTEICA DEL EXTRACTO CRUDO

Para la cuantificación proteica del extracto crudo se utilizó el método descrito por Bradford (1976). Este método es una prueba rápida y muy reproducible el cual consiste en la unión del colorante azul de Coomassie Brilliant Blue G-250 a la proteína ocasionando un cambio en el máximo de absorción del colorante de 365 nm a 595 nm. Primeramente se realizó una curva estándar con concentraciones de BSA (Albumina Serica Bovina) de 1, 2.5, 5, 10, 15 y 20 mg/mL. El procedimiento para la cuantificación de la muestra fue el siguiente: primero se tomó 1 μ L del extracto crudo y se disolvió en 99 μ L de agua destilada, se homogenizó, y posteriormente se le agregó 1 mL del reactivo de Bradford, se homogenizó nuevamente y se guardó en obscuridad por 10 minutos. El blanco estaba constituido de 100 μ L de agua y 1 mL de Bradford. Se analizó cuantitativamente con un espectrofotómetro (UV/VIS Perkin Elmer Lambda XLS) a una longitud de onda de 595 nm. Las muestras fueron procesadas por triplicado (Bradford, 1976).

3.4 PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO PROTEICO DE LA MIEL

3.4.1 Cromatografía por afinidad

Los diferentes componentes proteicos del extracto crudo (ECPMA) fueron obtenidos en función a su afinidad a la Concanavalina A Sepharosa 4B (Sigma) empacada en una columna de 12 x 2 cm. Como primer paso se equilibró la columna con 20 volúmenes del buffer Tris pH 6.8 25 mM, 0.5 M NaCl, 5 mM CaCl₂, MnCl₂ y MgCl₂. Luego se añadió 15 μ g del ECPMA y se le añadieron 5 volúmenes del buffer previamente mencionado; seguidamente se procedió a añadir 15 volúmenes de un

gradiente de glucosa que va de 0.1 a 1 M. Una vez finalizada la cromatografía se procedió a guardar la columna en un buffer de conservación (1M NaCl, 5mM CaCl₂, MnCl₂ y MgCl₂ con 20% de etanol) a 4°C. Las fracciones obtenidas fueron concentradas mediante columnas Amicon® ultra - 15 (3K) y posteriormente almacenadas a -20°C hasta su posterior análisis.

3.5 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICOS

3.5.1 SDS-PAGE

El ECPMA y las fracciones obtenidas por la cromatografía por afinidad se analizaron electroforéticamente por el método SDS-PAGE propuesto por Laemmli (1970). Se utilizaron concentraciones de 1 µg para el ECPMA, F1-F4 y para la fracción 5 se cargó el volumen máximo (12 µL) dentro de una solución de agua con buffer de carga desnaturizante (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8; 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol, y 0.002% de azul de bromofenol); luego se procedió a una desnaturalización física la cual consiste en tratar térmicamente las muestras a 95°C por 5 minutos. Una vez finalizado el tratamiento térmico, se procedió a cargar la muestra en un sistema electroforético. Se utilizó un sistema discontinuo, el cual consiste de 2 geles de diferente tamaño de poro, el primer gel fue el apilador, el cual estaba constituido de acrilamida/Bis-acrilamida al 4% (anexo 1), para la separación ECPMA se utilizó el gel de separación, el cual estaba constituido de acrilamida/Bis-acrilamida al 10 y 12% (anexo 2). La electroforesis se llevó a cabo a 100 V por 2.5 horas (Laemmli, 1970).

El método de revelado utilizado fue el de tinción con plata, el cual consistió de los siguientes pasos. Fijación: En esta etapa se dejó destiñendo el gel por dos horas en una solución de metanol al 25% (v/v), ácido acético al 10% (v/v) y formaldehído al 0.03% (v/v). Una vez concluida esta etapa, el gel se lavó cada 20 minutos (3 veces) por una hora con etanol al 30%.

Incubación con tiosulfato de sodio: Consistió en añadirle (una vez concluida la fijación) al gel una solución de tiosulfato de sodio al 0.01% (p/v) para luego ser incubado por un minuto a oscuridad en agitación. Una vez terminada la incubación se lavó 3 veces el gel por 20 segundos con agua destilada.

Tinción con plata: en este apartado el gel fue incubado por 20 minutos en oscuridad con nitrato de plata al 0.2% (p/v) y 0.14% (v/v) de formaldehído. Una vez concluida la incubación el gel fue lavado 2 veces por 20 segundos con agua destilada.

Revelado: Concluida la incubación, el gel fue introducido a una solución de revelado, el cual estaba constituido de carbonato de sodio al 6% (p/v), 0.03% (v/v) de formaldehído y 0.03% (v/v) de tiosulfato de sodio.

Detención del revelado: una vez que se visualizó el perfil de interés, la reacción de revelado (oxidación) fue detenida con una solución de metanol al 25% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) (Ramón et al., 2015).

3.5.2 Zimograma

Para la determinación de la actividad enzimática se emplearon métodos electroforéticos (zimograma). Para la determinación de la actividad proteolítica de las muestras se utilizaron 20-30 μg junto con agua destilada y buffer de carga nativo (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8; 10% glicerol, y 0.002% de azul de bromofenol); luego se procedió a cargar el homogenizado en un sistema electroforético nativo discontinuo, el cual consistió de un gel apilador al 4% de acrilamida/Bis-acrilamida y un gel separador al 8% de acrilamida/Bis-acrilamida (anexo 3). Las muestras fueron corridas a 100 V por 2.5 horas.

Una vez finalizada la corrida, se procedió a teñir el gel con azul de coomassie (0.1% de Azul de Coomassie R-250, 10% ácido acético, 45% metanol) por aproximadamente 40 minutos en agitación constante. Se pudo determinar la actividad proteolítica de las diferentes muestras visualizando en el gel zonas claras. Estas zonas claras fueron expuestas a proteasas presentes en las muestras las cuales tuvieron la capacidad proteolítica para degradar el sustrato (gelatina), por ende, estas zonas no pudieron teñirse con esta solución de tinción.

3.5.3 SDS-PAGE 2D

Se tomó 200 μL de las muestras y se aforó a 1000 μL con agua MiliQ, seguidamente se alicuotó en 2 tubos Falcon de 15 mL (500 μL por tubo) y se procedió a adicionarle 4 mL de acetona (frio) y se agitó vigorosamente para luego añadirle 500 μL de TCA. Se dejó precipitando por 2 horas a -20°C . Posterior a la precipitación se procedió a

centrifugar a 18,000 g por 15 minutos; se tomó el sobrenadante y se lavó la pastilla con acetona y se dejó evaporar en campana por 20 min. Finalmente se resuspendió la pastilla en buffer de rehidratación (Urea, 8M; Thiourea, 2M; CHAPS, 2%; DTT, 50 Mm; Y Anfolito, 0.2%) y se procedió a correr en función a su punto isoeléctrico (pI).

Primera dimensión: Se transfirió 135 µL de la muestra en el reservorio de tiras () y se incubo a 25°C por 1.4 horas. Seguidamente se colocó aceite mineral sobre las tiras y se dejó incubar por 16 horas a 18°C. Una vez finalizada la incubación las tiras fueron puestas en el equipo proteam i12 IEF con los siguientes parámetros:

PASO	VOLTAJE	GRAD.	µAMP.	VALUE
1	250	Rapid	50	0:15
2	4000	Grad.	50	1:00
3	4000	Rapid	50	15:00
4	500	Hold	50	-----

Segunda dimensión: se retiró la tira y se colocó en el reservorio junto en el buffer desnaturizante (Urea, Glicerol, DTT, SDS y Azul de bromofenol), se incubó por 15 min. a 25°C con agitación leve. Finalmente se retiró la tira y se corrió en un sistema electroforético desnaturizante (SDS-PAGE) previamente mencionado.

3.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

3.6.1 Captación del radical DPPH

Se cuantificó la capacidad de los extractos para estabilizar el radical DPPH (2,2-Difenil –1-Picrylhydrazyl), siguiendo la metodología propuesta por Shimada (1992) con ligeras modificaciones. A 100 µL de cada uno de los extractos se adicionó 1 mL de DPPH (0.1mM) diluido en alcohol etílico a 96%, se incubó a temperatura ambiente a 30 min y se midió la absorbancia a 517 nm. El porcentaje de captación de radicales DPPH se calcula con la siguiente ecuación:

$$\% \text{Captación de radicales DPPH} = \left\{ \frac{AB-AM}{AB} \right\} \times 100$$

AB= Absorbancia del blanco

AM = Absorbancia de la muestra

3.6.2 Poder reductor de Fe (III)

El poder reductor de los extractos se determinó mediante la metodología descrita por Oyaizu (1986). Se tomaron 250 µL de la muestra y se le añadieron 250 µL de buffer de fosfatos (0.2 M, pH 6.6) y 250 µL de ferricianuro de potasio al 1%, se agito vigorosamente y se incubó a temperatura constante (50°C, 20 min). Posteriormente se le adicionó 250 µL ácido tricloroacético al 10%. La mezcla resultante se centrifugó (548 x g, 10 min); se tomó una alícuota del sobrenadante (500 µL) a la cual se agregaron 400µL de agua destilada, inmediatamente se agregó cloruro férrico (100

μL , 0.1%); se incubó a 50°C durante 10 min y se dejó enfriar durante 10 min. Finalmente se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 700 nm. Para determinar el porcentaje de reducción de Fe(III) se calculó con la siguiente fórmula :

$$\%PR = \left\{ \frac{AM-AB}{AM} \right\} \times 100$$

%PR = Porcentaje del poder reductor

AB= Absorbancia del blanco

AM = Absorbancia de la muestra.

3.6.3 Capacidad quelante de Cu^{2+}

Para la determinación de la capacidad quelante de las proteínas se determinó mediante los fundamentos propuestos por Carter (1971) modificado. Se preparó el blanco mezclando 1200 μL tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 6) + 25 μL de violeta de pirocatecol 4 mM. El control se preparó mezclando con 1100 μL tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 6) + 100 μL de agua destilada + 100 μL de solución patrón de Cu (II) (40.0 mg/mL) + 25 μL de violeta de pirocatecol 4 mM. La muestra se preparó con 1000 μL tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 6) + 100 μL de solución patrón de Cu (II) (40.0 mg/mL) + 25 μL de violeta de pirocatecol 4 mM se dejó reaccionar durante 5 min a temperatura ambiente y luego añadir 100 mL de muestra. Si la muestra tiene capacidad quelante se produce una disminución de la absorbancia a 632 nm. Se calcula el porcentaje de capacidad quelante como sigue:

$$\%CQ = \left\{ \frac{1 - \text{AbsVPCuM}}{\text{AbsVPCu}} \right\} \times 100$$

Dónde:

%CQ = Porcentaje de capacidad quelante.

AbsVPCuM = absorbancia del complejo de violeta de pirocatecol-Cu (II) en presencia de muestra.

AbsVPCu = absorbancia del complejo de violeta de pirocatecol-Cu (II).

3.7 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

3.7.1 Determinación de la Actividad antimicrobiana por difusión en disco

La actividad antimicrobiana de las muestras fue evaluada por el método de difusión en disco. Se utilizaron cajas Petri con medio Muller-Hinton agar. El inóculo utilizado fue de 0.5 en la escala McFarland, lo cual equivale a 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC). Posteriormente, se le añadió al medio con un hisopo una concentración de 1×10^6 unidades formadoras de colonias. Como control positivo (+) se utilizó ampicilina para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y ciprofloxacino para *Escherichia coli* ATCC 25922. Como control negativo (-) se utilizó buffer de fosfatos y glucosa 1M. Las cajas Petri fueron incubadas a 37° C durante 12 horas. La formación de halos transparentes alrededor de los discos representa la inhibición de crecimiento microbiano (Wanger, 2007).

3.7.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima no inhibitoria (NIC) mediante microdiluciones

El ECPMA se homogenizó dentro de tubos eppendorf (1.5 mL) con agua destilada (dependiendo del volumen utilizado en las muestras y el volumen utilizado en el inóculo; el volumen final entre la muestra, agua destilada y el inóculo fue de 250 μ L), con 250 μ L de medio LB 2X y el respectivo inóculo (5×10^5 UFC) con un volumen final de 500 μ L. Para *S. aureus* se comenzó con la concentración de 3200 μ g/mL, seguidamente se diluyó 2 veces hasta alcanzar una concentración de 1600 μ g/mL y así sucesivamente hasta alcanzar la concentración más baja que fue de 25 μ g/mL. Para *E. coli* se utilizaron concentraciones mayores a las utilizadas por *S. aureus*. Se comenzó con una concentración de 5000 μ g/mL, seguidamente se diluyó 2 veces hasta alcanzar una concentración de 2500 μ g/mL, y así sucesivamente hasta alcanzar una concentración de 39 μ g/mL. Una vez finalizado con lo anterior, todas las muestras fueron incubadas a 37°C por 24 horas a 250 rpm. La inhibición del crecimiento bacteriano fue medido en un espectrofotómetro (Biofotómetro 6131 Eppendorf) a 600 nm. Las muestras fueron preparadas por triplicado (Qaiyumi, 2007).

3.7.3 Determinación del tipo de actividad antibacteriana

Una vez finalizado el método de la concentración mínima inhibitoria por microdiluciones, se procedió a tomar 50 μ L de cada tubo que no mostró visualmente crecimiento bacteriano y se diseminó en medio LB agar con ayuda de un hisopo. Seguidamente se incubó por 24 horas a 37°C. Por otra parte, el inóculo de inicio

(5×10^5) se diluyó 1000 veces, luego se tomó 50 μL y se diseminó en medio LB agar y se incubó por 24 horas a 37°C . Finalmente, luego de la incubación se procedió a contar las colonias provenientes de los tubos con tratamiento. Si el número de colonias es igual o inferior a las del control se afirmara la actividad antibacteriana del tipo bactericida (Qaiyumi, 2007).

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CONTENIDO PROTEICO

La miel de *Apis mellifera* regional posee un contenido proteico del 0.12% (0.1214 g de proteína/100 g de miel) lo cual cae dentro de los estándares físico-químicos de este producto a nivel mundial, y que además ya ha sido reportado en diversos estudios (0.1 – 0.5%) tales como el de Chua y colaboradores (2015).

4.2 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICOS

4.2.1 Por métodos desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se realizó un perfil proteico comparativo de la miel de *Apis mellifera* con dos concentraciones de Acrilamida/Bis-acrilamida (10 y 12%), esto con el fin de poder visualizar de mejor manera las bandas superiores e inferiores a las de ~25 kDa (figura 7). Con el programa Gel Doc™ EZ de Bio Rad se obtuvieron el número de bandas de cada perfil, intensidad de la banda y sus respectivos pesos moleculares. Con el gel separador al 10% se pudo observar un total de 11 bandas diferentes, mientras que con el gel separador al 12% se pudo observar un total de 13 bandas, observándose mejor aquellas bandas menores a 25 kDa. Asimismo, se observó una banda de aproximadamente 5 kDa pudiendo ser el péptido antimicrobiano

defensina-1. Por medio de esta técnica desnaturizante se llegó a la conclusión que el perfil proteico del ECPMA posee un aproximado de 14 bandas.

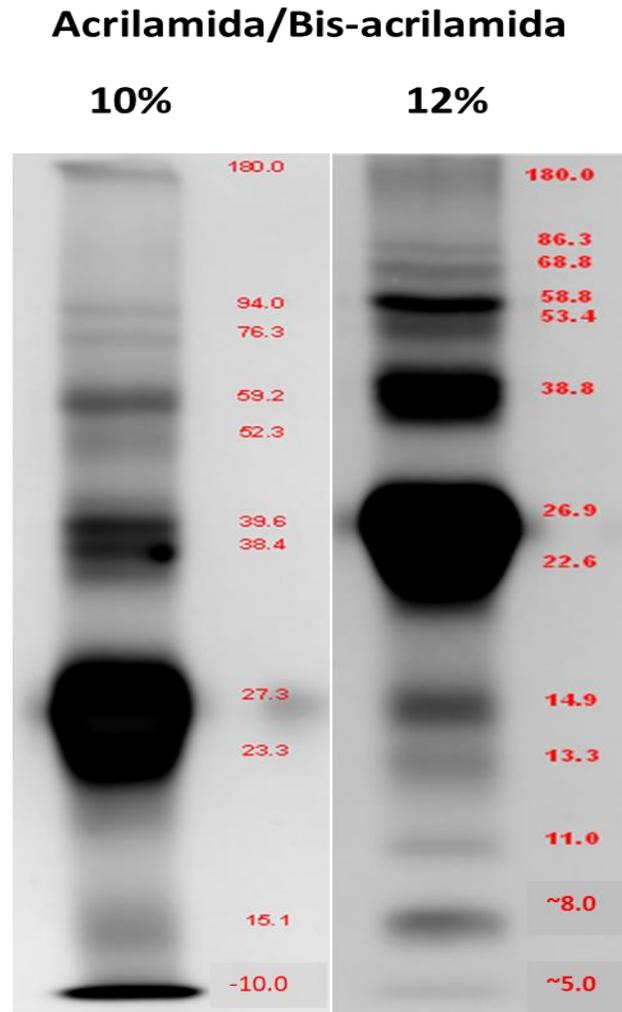


Figura 7: Análisis electroforéticos del extracto proteico de la miel de *Apis mellifera*.

Por otra parte, en ambos perfiles, la proteína (s) o las subunidad (es) correspondientes a las bandas de ~23 y ~27 kDa del EPMA fueron las más abundantes, con aproximadamente el 60% del contenido total proteico. Chua y

colaboradores (2015) identificaron mediante espectrometría de masas a las proteínas presentes en las mieles de Acacia, Tualang, y Gelam de Malasia. Estos autores identificaron a las proteínas MRJP1, MRJP2, MRJP5 y MRJP7 siendo la MRJP1 la más abundante en estas mieles.

En la miel de acacia se reportaron proteínas con pesos moleculares de 20.12 y de 27.12 las cuales tuvieron homología con precursores de la proteína MRJP1 en la base de datos de la página NCBI. Estos autores mencionan que bandas menores a 44.67 pueden ser productos de degradación de la MRJP1. Por otra parte Simuth y colaboradores (2004) analizaron el contenido proteico de mieles de diferentes regiones, llegando a la conclusión de que la proteína más abundante fue la Apalbumina 1 (MRJP1). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en ambos perfiles proteicos en el que las bandas de ~23 y ~27 kDa del ECPMA fueron las más abundantes y tuvieron pesos moleculares similares a los reportados por Chua y colaboradores (2015). Esto nos puede indicar que en ambas mieles puede predominar la proteína MRJP1.

4.2.2 Identificación del proteoma

Para la identificación proteica se tomaron diferentes parámetros. Normalmente esta es aceptable si la probabilidad es mayor al 95% y contiene al menos 2 secuencias peptídicas identificadas en un 70-80%. Por otra parte, teniendo un score mayor al 30% puede indicar una probabilidad de identificación del 95% (Kong et al., 2010). Otro parámetro de discriminación utilizado en el presente estudio fue el “#proteínas”

(parámetro presente en la hoja de datos de la secuenciación a analizar). Aquellos péptidos identificados que hicieron match con una sola proteína fueron tomados en cuenta. En la tabla 2 Se pueden observar las posibles proteínas que se pueden encontrar en las bandas cortadas del gel (SDS-PAGE) Figura 8.

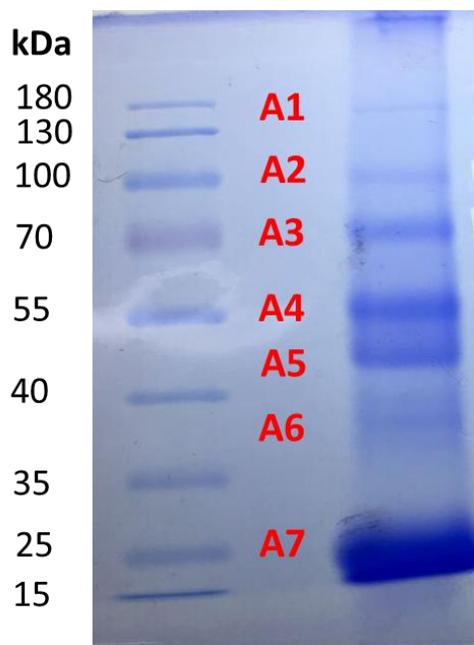


Figura 8: Bandas cortadas (A1-A7) obtenidas por métodos electroforéticos (SDS-PAGE) para secuenciar.

Cabe mencionar que para tener una mayor certeza en la identificación proteica se requiere una secuenciación por ESI MS/MS, ya que ambas técnicas pueden ser complementarias. Analizando las muestras con ambos métodos al mismo tiempo nos puede dar un mejor análisis y discernimiento de las proteínas presentes en las bandas (Chua et al., 2013). De igual forma, para tener una identificación proteica más apropiada se requiere separar a las proteínas en función a su punto isoeléctrico

y a su peso molecular por las técnica de SDS-PAGE 2D, cortar los spots y posteriormente secuenciarlos. Debido a lo mencionado anteriormente, en el presente documento se muestran a las proteínas identificadas como “posibles proteínas”.

Tabla 2: Proteínas que se pueden encontrar en las bandas cortadas y posteriormente secuenciadas.

Banda	Proteína (s)
A1	<ol style="list-style-type: none"> 1. Glucosa deshidrogenasa 2. MRJP1 3. MRJP2 4. MRJP3
A2	<ol style="list-style-type: none"> 1. Glucosa oxidasa 2. MRJP1 3. MRJP3 4. MRJP5
A3	<ol style="list-style-type: none"> 1. MRJP1 2. MRJP2 3. MRJP3
A4	<ol style="list-style-type: none"> 1. MRJP1 2. MRJP2 3. MRJP3

	4. MRJP5
	5. MRJP6
A5	1. MRJP1
	2. MRJP2
	3. MRJP3
	4. MRJP5
A6	1. MRJP1
	2. MRJP3
A7	1. MRJP1

Tal y como se observa en la tabla 2, las proteínas identificadas fueron las enzimas Glucosa oxidasa y Glucosa deshidrogenasa, así como a las proteínas MRJP1, 2, 3,5 y 6. Por otra parte, Di Girolamo y colaboradores (2012), identificaron el proteoma de cinco mieles monoflorales procedentes de Italia (castaña, girasol, acacia, eucalipto y naranjo). Este grupo de trabajo identificó a la enzima α -glucosidasa y al péptido antimicrobiano defensina-1 los cuales no fueron identificados en el presente estudio. De igual forma identificaron a cinco proteínas pertenecientes a la familia MRJP (MRJP1-5) las cuales fueron las más abundantes. En el mismo contexto, Rossano y colaboradores (2012) elucidaron el proteoma de mieles uniflorales (naranjo, castaña, eucalipto y zulla) provenientes del sur de Italia. Estos autores

encontraron a las proteínas MRJP1-5, a las enzimas α – glucosidasa, glucosa oxidasa y súper oxido dismutasa y a la proteína apimisinina.

Con lo mencionado anteriormente, se puede observar que las proteínas que pueden ser las constituyentes principales de mieles Italianas son las MRJP1-5, mientras que las proteínas MRJPs que se pueden encontrar en las mieles regionales también son 5, pero difiere en que la MRJP4 no se localizó en la miel regional mientras que la MRJP6 no se encontró en las mieles de Italia. Con lo mencionado anteriormente se pueden establecer parámetros de discriminación entre mieles de diferentes regiones en función al contenido de las proteínas MRJPs.

4.2.3 SDS-PAGE-2D

Este método separa a las proteínas en función a su punto isoeléctrico (primera dimensión) y a su peso molecular (segunda dimensión), por lo cual es la hace la técnica electroforética más sensible y adecuada para determinar el contenido real de diferentes proteínas en un medio, en este caso particular, la miel.

Con esta técnica se pudo determinar que la miel de *Apis mellifera* regional posee al menos 20 proteínas diferentes. Se puede observar que al menos 5 bandas pueden albergar a más de 2 proteínas, algo que con la técnica SDS-PAGE no se hubiese podido determinar. Esto nos muestra, que tal y como se había observado y discutido en la identificación del proteoma, que cada banda puede albergar a más de una proteína. La banda de ~25 kDa (precursor MRJP1) puede albergar hasta 8 proteínas diferentes, esto puede justificar su intensidad dentro del perfil por SDS-PAGE. Con

este resultado podemos observar que en esta banda se encuentran variantes de hidrolizados de la proteína MRJP1, los cuales pueden diferir en su glicosilación y en su sitio de proteólisis.

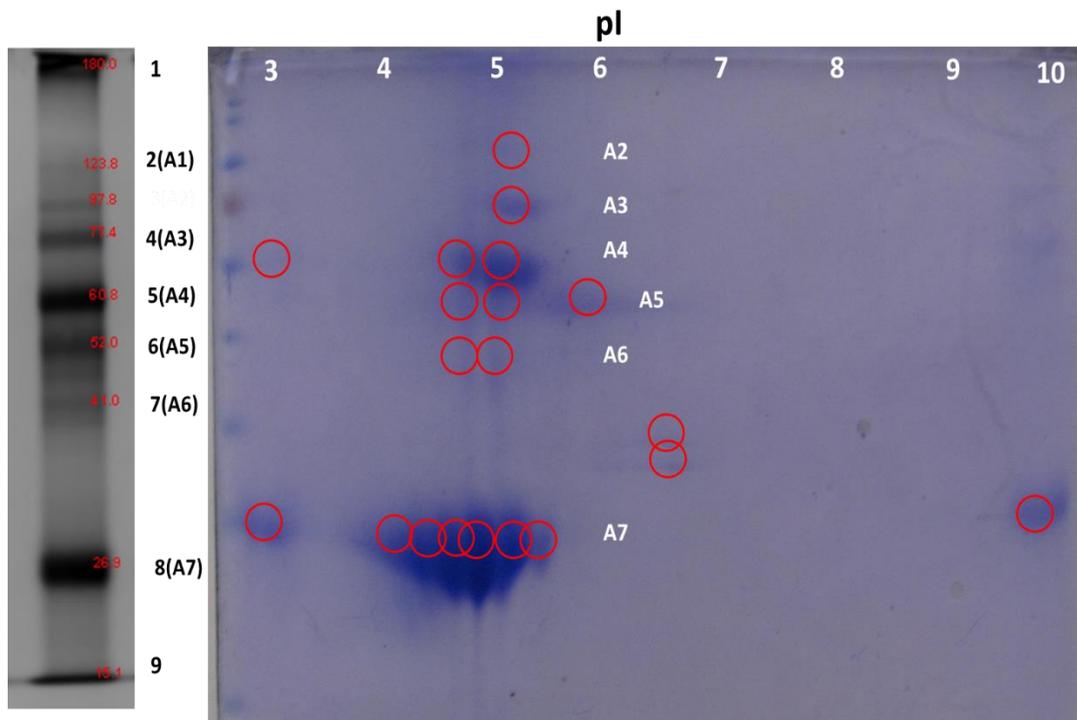


Figura 9: Perfil electroforético del ECPMA por la técnica de SDS-PAGE 2D. Los spots se encuentran marcados por círculos rojos.

Por otra parte, se puede observar que el punto isoeléctrico de la mayoría de las proteínas de la miel se encuentra entre el pH 4 y 5. Este dato es esperado debido a que el pH de la miel oscila entre 3.5.

4.3 PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA MIEL DE APIS

La familia proteica MRJP está conformada por 9 proteínas altamente glicosiladas (MRJP1-MRJP9) con pesos moleculares que comprenden de 45 a 68 kDa. Estas macromoléculas son altamente homólogas ya que comparten 111 aminoácidos conservados (Buttstedt et al., 2013). Por lo mencionado anteriormente es muy complicada su separación por lo cual se optó por la cromatografía por afinidad glicosídica.

Se obtuvieron 5 fracciones (F1-F5) siendo la F1 la cual albergo a proteínas no glicosiladas o muy poco glicosiladas. Por otra parte, en las fracciones 2-5 se encontraron proteínas glicosiladas las cuales tuvieron la facultad de unirse a la Concanavalina A. finalmente, para la validación de la separación se realizó un SDS-PAGE (figura 9).

Se pudo observar que debido a la gran cantidad y a la diversidad proteica de la miel no se pudieron purificar en su totalidad a estas biomoléculas, en su lugar, obtuvimos un conjunto de proteínas por fracción (esta diferenciación está dada principalmente por su nivel de glicosilación) tal y como se puede apreciar en la figura 10.

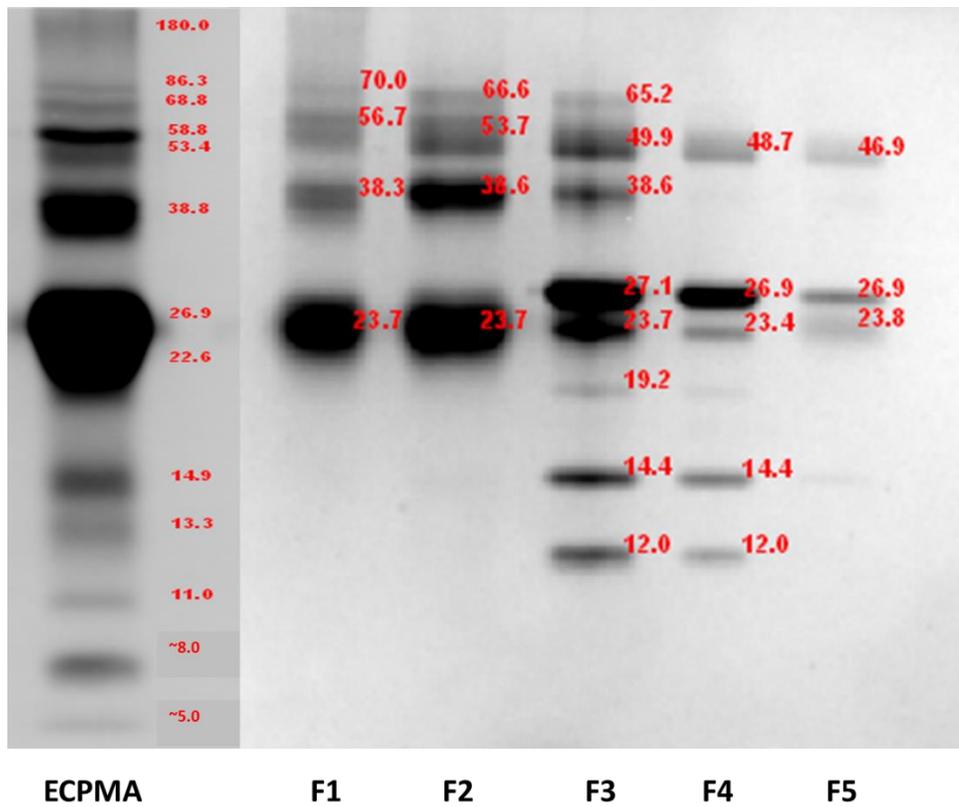


Figura 10: Validación de la separación proteica del ECPMA por SDS-PAGE.

Por otro lado, se pudo observar en todas las fracciones a los hidrolizados de la proteína MRJP1 (~25 kDa). Esto se puede justificar debido a que tal y como se había observado por la técnica de SDS-PAGE 2D, la banda de ~25 kDa podía albergar hasta 8 proteínas diferentes, las cuales provienen de la proteína MRJP1, tal y como se reporta con los datos obtenidos en la secuenciación.

4.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Una vez observado que el extracto proteico contiene gran cantidad de hidrolizados de la proteína MRJP1, se procedió a evaluar al ECPMA para ver si contenía enzimas proteolíticas. Para ello se realizó un zimograma que contenía como sustrato gelatina al 2%.

Se pudo observar que la fracción 1 y por consiguiente el ECPMA contienen al menos una proteasa, esto se dedujo debido a la zona clara de hidrolisis que se pudo visualizar en el gel (figura 11).

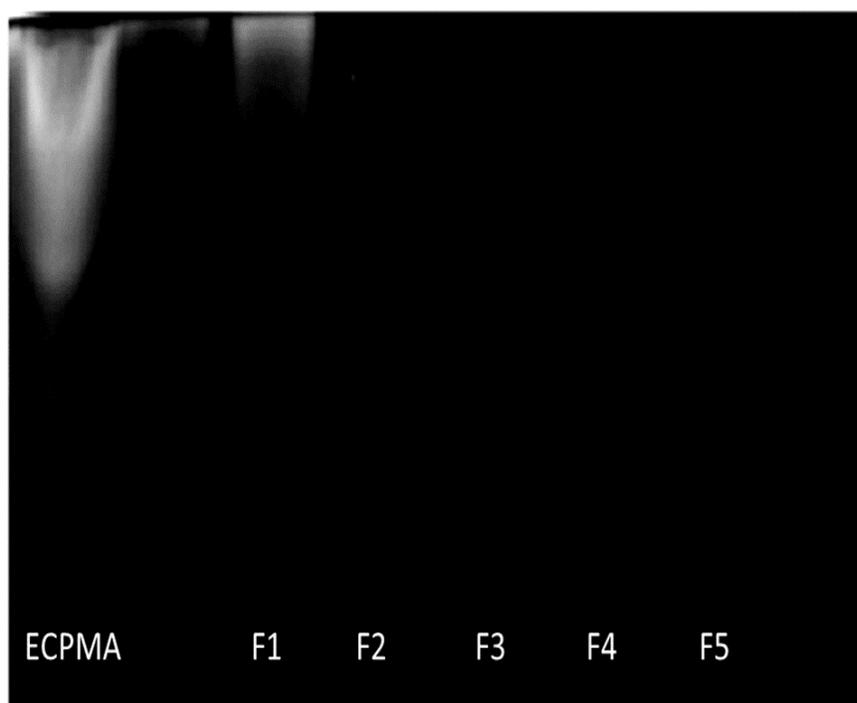


Figura 11: Zimograma. Carril I, ECPMA; carril II, F1; carril III, F2; carril IV, F3; carril V, F4, carril VI, F5.

Es importante mencionar que, Rossano y colaboradores (2012) en su estudio reportaron la presencia de serin-proteasas en las mieles regionales del sur de Italia (miel de naranjo, castaña, eucalipto y de zulla). De igual forma, estos autores mencionan que estas proteasas son capaces de hidrolizar a las proteínas MRJP, en especial a la MRJP1. Por lo cual, con lo mencionado anteriormente y recopilando datos obtenidos por Chua y colaboradores (2015) se puede hacer alusión a que los precursores de la MRJP1 (~ 25 kDa) presentes en las mieles de Malasia y posiblemente en las regionales sean producto de estas enzimas.

En el mismo contexto, López (2016) reportó la presencia de una proteasa de tipo serina en la jalea real de *Apis mellifera*. Por otra parte, Girolamo y colaboradores (2012) mencionan que las proteínas presentes en las mieles son semejantes a las proteínas presentes en la jalea real, excepto a que la variedad de proteínas en las mieles es mucho menor y en ordenes inferiores con respecto a su cantidad. Con lo mencionado anteriormente, es posible que la proteasa de tipo serina presente en la jalea real regional sea la misma a las de las mieles regionales de *Apis mellifera*.

Por otra parte, una vez observada la actividad proteolítica en la fracción 1 se procedió a realizar un SDS PAGE 2D para determinar el número de proteínas diferentes presentes en la fracción, sabiendo que dentro de esta misma se encuentra al menos una proteasa (figura 12).

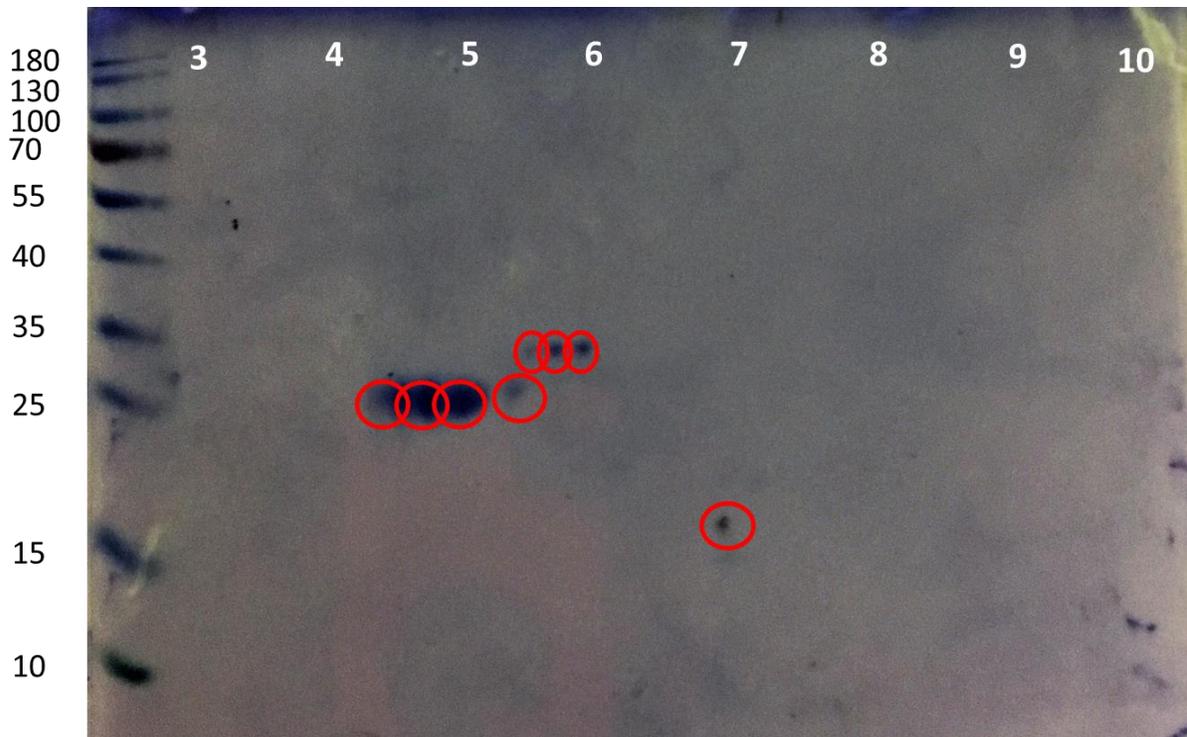


Figura 12: SDS PAGE 2D de la fracción 1.

Se puede observar en la figura 12 que la fracción número 1 posee al menos 8 proteínas diferentes. Se pueden observar 4 proteínas con pesos moleculares de ~25 kDa con pI que van de 4 a 5.5. Estas proteínas, que tal y como se ha comentado en secciones anteriores pudieran ser fragmentos de la proteína MRJP1. Por otra parte se pueden observar 3 proteínas con pesos moleculares que oscilan en 35 kDa con pI que comprenden de 5 a 6. Algo interesante por mencionar es que estas 3 proteínas no se observaron en el SDS PAGE 2D realizado con el extracto crudo. Esto puede ser debido a la presencia de proteínas que se encuentran en mayor cantidad y por ende en mayor concentración en el extracto que estas últimas previamente mencionadas. En el mismo contexto, la última proteína que se puede

apreciar en el gel tiene un peso molecular de 18 - 20 kDa y un pI de 6.5 - 7. Al igual que las tres proteínas previamente mencionadas, esta última no se encuentra en el gel del extracto proteico, teniendo la misma discusión comentada previamente. Rossano y colaboradores (2012) en su estudio determinaron por métodos electroforéticos no desnaturalizantes (Zimograma 2D) la presencia de proteasas de tipo serina en mieles monoflorales de Italia. En la miel de Eucalipto estos autores encontraron a un grupo de proteasas con pesos moleculares que oscilan entre 21 a 23.6 kDa con un pI de 6.4 a 8. En la miel de Castaña encontraron proteasas con pesos moleculares de 22.8 kDa y con pI de 5.9 - 6.6. Por último, en la miel de Zulla localizaron zonas de degradación pertenecientes a proteasas con pesos moleculares de 24 kDa y con pI de 4.9 - 6,8. Con lo mencionado anteriormente, la proteasa presente en la fracción 1 se podría localizar en el gel (SDS PAGE 2D) y puede estar representada con el spot de ~18-20 kDa y un pI de ~6.5 - 7.

4.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

4.5.1 Actividad de captación de radicales libres por el método DPPH

Se realizó este método para evaluar la capacidad antioxidante en la forma reductora como donador de átomos de Hidrogeno del ECPMA y de las 5 fracciones obtenidas por cromatografía por afinidad. Se pudo observar que el ECPMA y cuatro de las cinco fracciones tuvieron la capacidad de reducir a este radical. Con el programa GraphPad Prism 7.0 se calcularon las concentraciones requeridas para neutralizar

en un 50% al radical (IC₅₀) del ECPMA y de la F1, teniendo un IC₅₀ de 3.42 y 10.11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ respectivamente (figura 13).

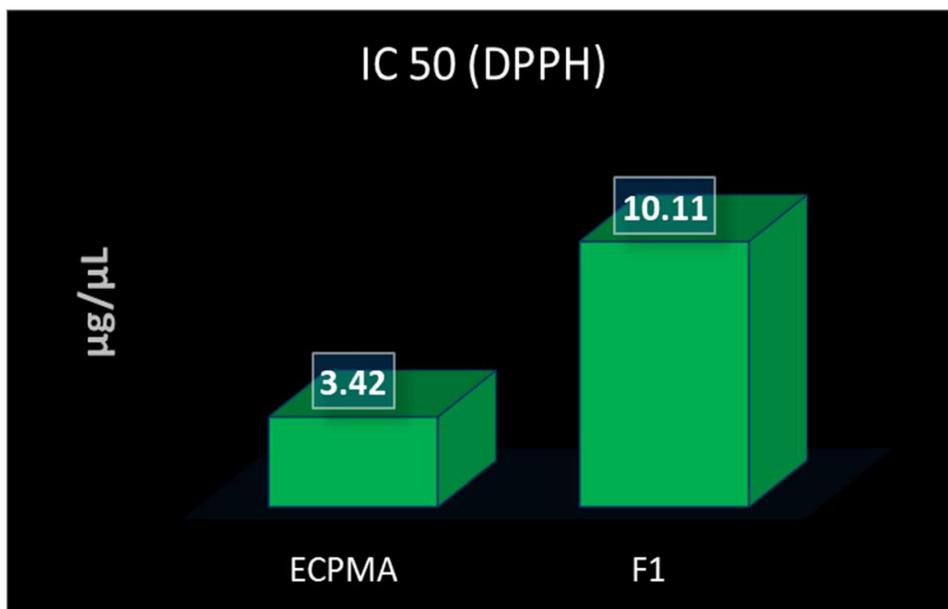


Figura 13: IC₅₀ del ECPMA y de la fracción 1 obtenido por el método DPPH.

Por otra parte, se utilizó ácido ascórbico como control, el cual tuvo un IC₅₀ de 0.01804 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Esto quiere decir que la capacidad reductora del extracto proteico de la miel de *A. mellifera* no es muy alta. Esto puede ser debido a que el extracto posee un complejo de proteínas las cuales pueden enmascarar la cantidad real de aquella proteína con posible actividad reductora. Se requerirán métodos cromatográficos más exactos para obtener la proteína con actividad biológica y su respectivo IC₅₀. De igual forma se obtuvieron los porcentajes de inhibición de las fracciones 2-5 por este mismo método (figura 14). Se observó que la fracción 2

obtuvo un gran porcentaje de inhibición, pudiendo contener las principales proteínas que le brindan la capacidad antioxidante al extracto proteico.

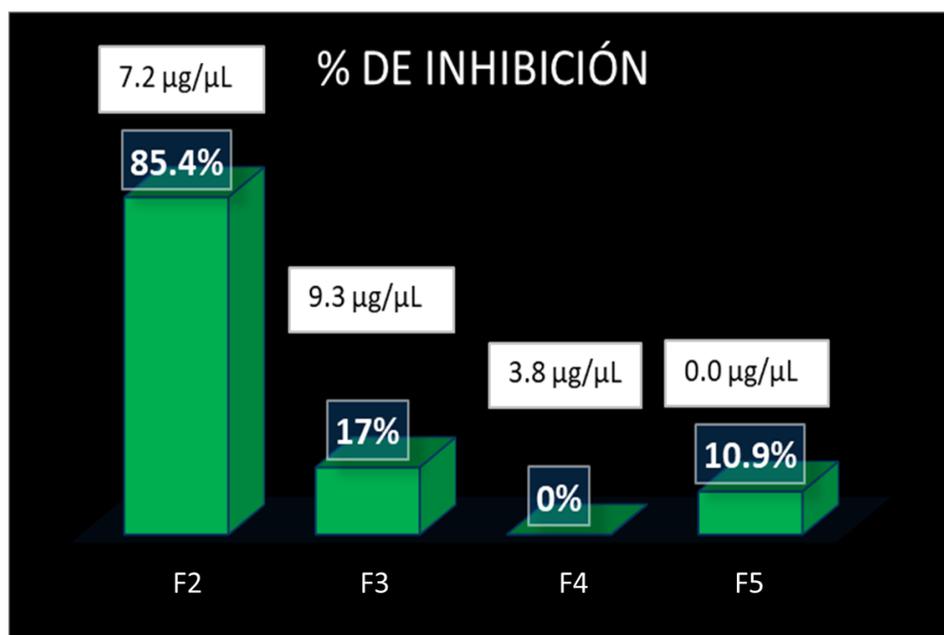


Figura 14: Porcentajes de inhibición de las fracciones 2-5.

Chua y colaboradores (2015) determinaron la capacidad antioxidante de las mieles de Acacia, Tualang y Gelam provenientes de malasia. Ellos evaluaron la capacidad reductora de los extractos por el método de DPPH teniendo como resultados los siguientes: El IC 50 para la miel de Acacia fue de 0.78 µg/µL, para la miel de Tualang fue de 0.93 µg/µL y para la miel de Gelam fue de 1.08 µg/µL. El IC 50 del extracto proteico de la miel regional fue de 3.42 µg/µL, el cual no es tan efectivo contra el radical evaluado en comparación con las mieles de Malasia. Esto puede ser debido

por factores regionales, los cuales podrían influir en la diferenciación proteica e incluso en su cantidad.

Por otra parte Nagai e Inoue (2004) analizaron la capacidad antioxidante de los extractos proteicos de la jalea real por el método de DPPH. Estos autores mencionan en su estudio que con cantidades mayores a 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ podían reducir al radical DPPH en un 14%. Esto significa que el poder reductor del extracto proteico de la miel regional es mucho más efectivo ya que con menos cantidad de proteína se puede alcanzar una inhibición de este radical del 50%. Las proteínas MRJPs representan aproximadamente el 90% del contenido total proteico soluble en jalea real (Schmitzova et al., 1998; Sano et al., 2004; Santos et al., 2005; Scarselli et al. 2005). Con estos resultados se puede hacer alusión a que esta familia proteica puede ser la responsable de la actividad antioxidante tanto en la fracción proteica de la jalea real como de la miel, que tal y como se había discutido en la sección anterior, las proteínas predominantes en las mieles evaluadas por Chua y colaboradores (2015) y Girolamo y colaboradores (2012) fueron las MRJPs.

4.5.2 Ensayo poder reductor de FeIII

Se observó que el extracto proteico de la miel de *Apis mellifera* fue capaz de reducir al FeIII, lo cual demostró la capacidad reductora (dador de electrones) de estas proteínas. Por otra parte se pudo observar que el ECPMA tuvo un IC 50 de 16.37 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (figura 15), mientras que el IC50 del ácido ascórbico fue de 0.003 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, lo cual muestra una vez más que la capacidad del extracto no es tan sobresaliente

como la del ácido ascórbico. Tal y como se discutió en la sección anterior, esto puede ser debido a que en el extracto se encuentran diferentes proteínas las cuales pueden enmascarar la verdadera cantidad de aquella proteína con capacidad antioxidante.

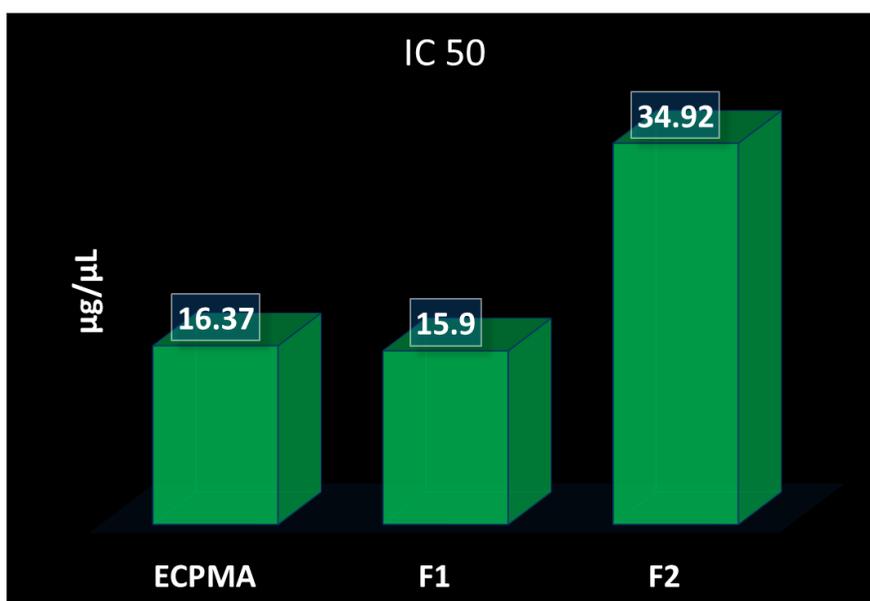


Figura 15: IC₅₀ del ECPMA y de la fracción 1 y 2 obtenido por el método reductor de FeIII.

Asimismo, se determinó la capacidad antioxidante de las cinco fracciones, siendo únicamente las fracciones 1 y 2 a las cuales se les pudo determinar su IC₅₀ con 15.9 y 34.92 µg/µL respectivamente. Cabe mencionar que las fracciones 3-5 tuvieron una actividad antioxidante ligera con porcentajes de inhibición de hasta 30% con concentraciones de 37 µg/µL (F4) (datos no mostrados). Con los datos obtenidos se puede mencionar que las proteínas presentes en la fracción 1 pueden ser las principales responsables de brindarle la capacidad antioxidante del tipo

reductora al extracto proteico, esto debido a que su IC 50 (15.9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) es casi similar al del extracto (16.37 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), y que las demás proteínas presentes en las fracciones 2 a 5 pueden contribuir con esta propiedad.

Por otra parte, en el SDS PAGE 2D de la fracción 1 (figura 12) se pueden observar principalmente fragmentos de ~25 kDa los cuales puedan ser los responsables de la actividad antioxidante. Por lo cual, una de las posibles funciones de estas proteínas sea la de proteger a la miel de los radicales libres presentes en el medio.

El método DPPH muestra la capacidad reductora de las muestras en la forma de donación de átomos de Hidrogeno, por otra parte, el método reductor de FeIII evalúa la capacidad reductora de las muestras por medio de la donación de electrones. La cantidad requeridas del ECPMA para reducir en un 50% al FeIII fue de 16.37 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Por otra parte la cantidad requerida del ECPMA para inhibir en un 50% al radical DPPH fue de 3.42 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Con estos resultados se puede observar que los extractos proteicos actúan mejor como reductores en función a la donación de átomos de Hidrogeno.

4.5.3 Capacidad quelante de Cu^{2+} del ECPMA

Tal y como se había comentado en la sección anterior, el ECPMA mostró capacidad antioxidante de tipo reductora (donación de electrones y donación de átomos de hidrogeno). Por otra parte, este mismo extracto no mostró tener la capacidad queladora y esto se determinó con el ensayo de Cu^{2+} . Cabe mencionar que hasta

el momento no existen reportes los cuales hayan evaluado la capacidad quelante de las proteínas de la miel ni de otro producto de la colmena.

Los aminoácidos pueden actuar como queladores debido a que pueden utilizar al nitrógeno del grupo amino y al oxígeno del grupo carboxilo para “secuestrar” a los iones metálicos tal y como se aprecia en la figura 16. Estos aminoácidos lo hacen de tal forma que dos o tres de ellos se unen a un solo ion (Ashmead. H, 1991).

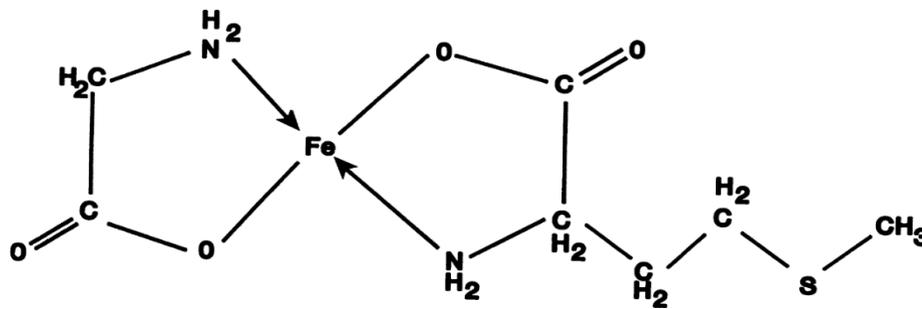


Figura 16: Glicina y metionina incorporando a su estructura a un ion metálico (Ashmead. H, 1991).

Los aminoácidos no terminales presentes en las proteínas de la miel tienen ocupados sus átomos de nitrógeno del grupo amino y el átomo de hidrogeno que participa en los enlaces de los quelatos se pierde debido al enlace peptídico. Esto ocasiona impedimentos estéricos impidiendo la unión de iones, tales como el de cobre. Los aminoácidos que pueden ser queladores son los que poseen carga positiva y negativa. Siguiendo en el mismo contexto es posible que las proteínas presentes en las mieles no cuenten o en su defecto, posean pocos de estos

aminoácidos “libres” los cuales sean capaces de interactuar con iones metálicos presentes en el medio exterior. Con estos resultados se observa que los extractos proteicos poseen únicamente capacidad antioxidante del tipo reductora (donación de átomos de hidrogeno y donación de electrones) pero no del tipo quelante.

4.6 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

4.6.1 Actividad antimicrobiana por difusión en disco

Para la actividad antimicrobiana se evaluaron los extractos proteicos (mayores a 3 kDa) de la miel de *Apis mellifera* contra las bacterias patógenas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se pudo observar que el ECPMA tuvo actividad antimicrobiana contra una cepa Gram positiva como lo es *S. aureus* (figura 17 A). Por otra parte, se evaluó la capacidad antimicrobiana del ECPMA contra una bacteria Gram negativa como lo es *E. coli* y tal y como se había comentado en el párrafo anterior, este extracto tuvo también la capacidad de inhibir el crecimiento de este microorganismo (figura 17 B).

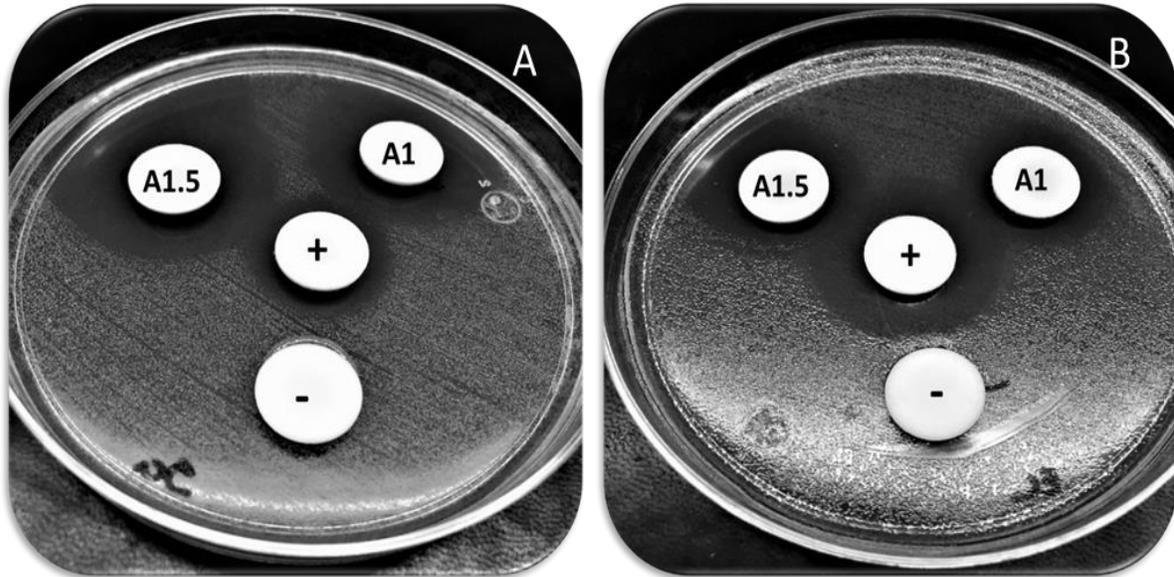


Figura 17: Actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco del ECPMA contra *Staphylococcus aureus* (A) y *Escherichia coli* (B). A1.5 = 1.5 mg, A1= 1 mg.

Para determinar que bacteria fue más susceptible a las proteínas de la miel de Apis se procedió a medir los halos de inhibición los cuales se presentan en la figura 18.



Figura 18: Diámetros de los halos de inhibición del ECPMA contra *S. aureus* y *E. coli*.

Se pudo observar que la bacteria *S. aureus* fue más propensa a la inhibición del ECPMA debido a que su halo de inhibición fue mucho mayor. Esta bacteria es de tipo Gram positiva por lo que la proteasa presente en el extracto podría estar influyendo en esta capacidad. Se requerirán otras técnicas como la inactivación proteolítica para corroborar esta teoría.

4.6.2 Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima no inhibitoria (NIC)

Para determinar el MIC y el NIC se utilizó el método propuesto por Lambert & Pearson (2000, modificado). Estos autores determinaron estos valores utilizando la regresión no lineal; insertando los valores de X como el logaritmo de la concentración del antibiótico (en este caso el ECPMA). Seguidamente, ajustaron los datos al modelo Gompertz. Para obtener estos valores se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 7.

Tal y como se había observado con la actividad antimicrobiana por difusión en disco, nuevamente el ECPMA resultó ser más efectivo contra la bacteria Gram positiva *S. aureus* teniendo un MIC de 932.3 µg/mL (Figura 19) en comparación con *E. coli* el cual tuvo un MIC de 2243 µg/mL (Figura 20).

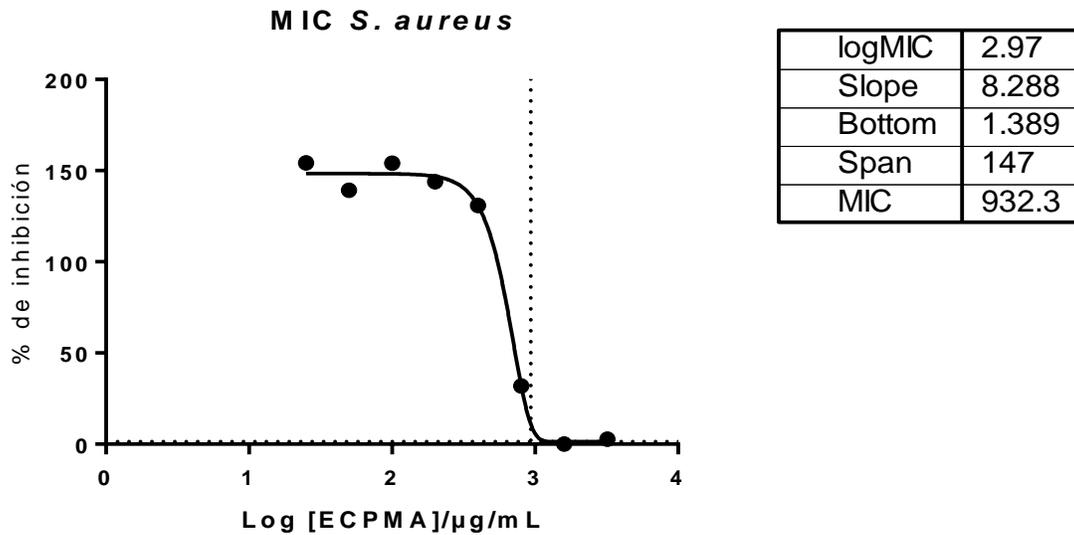


Figura 19: MIC del ECPMA vs *S. aureus* obtenido por métodos estadísticos.

En el mismo contexto, se pudo observar que con concentraciones inferiores a 400 y 1250 µg/mL para *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente, se favoreció a la proliferación bacteriana en más del 100% (tomando como 100% el crecimiento bacteriano en el control positivo). Esto puede ser debido a que en el extracto coexisten varias proteínas, de las cuales, algunas de estas podrían actuar principalmente como fuente de nitrógeno y no como agentes antibacterianos. Por lo tanto, es muy probable que aquella proteína con actividad antimicrobiana se encuentre en bajas cantidades dentro del extracto.

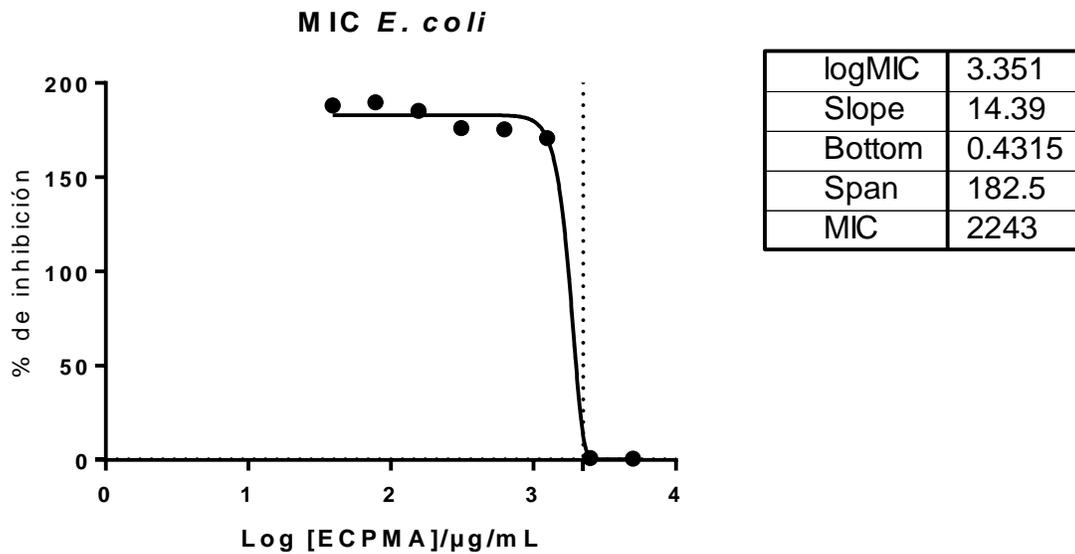


Figura 20: MIC del ECPMA vs *E. coli* obtenido por métodos estadísticos.

Por otra parte, se obtuvo la concentración mínima no inhibitoria (NIC) la cual es la concentración del antibiótico en el cual no se aprecia un decremento significativo de células viables, lo cual significa que a concentraciones mayores a las del NIC se obtendrán resultados significativos en cuanto al decremento celular y como consecuencia, a la muerte bacteriana. Tal y como se observó en el MIC, *S. aureus* mostró ser nuevamente la bacteria más susceptible a las proteínas de la miel, teniendo un NIC de 438.1 µg/mL (Figura 21) en contraste con *E. coli*, el cual obtuvo un NIC de 1452 µg/mL (Figura 22).

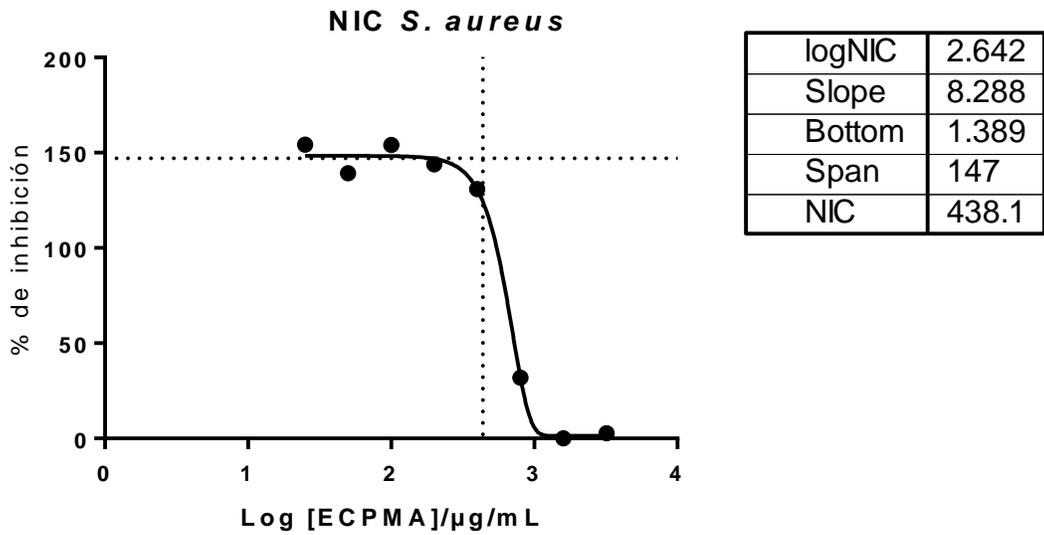


Figura 21: NIC del ECPMA vs *S. aureus* obtenido por métodos estadísticos.

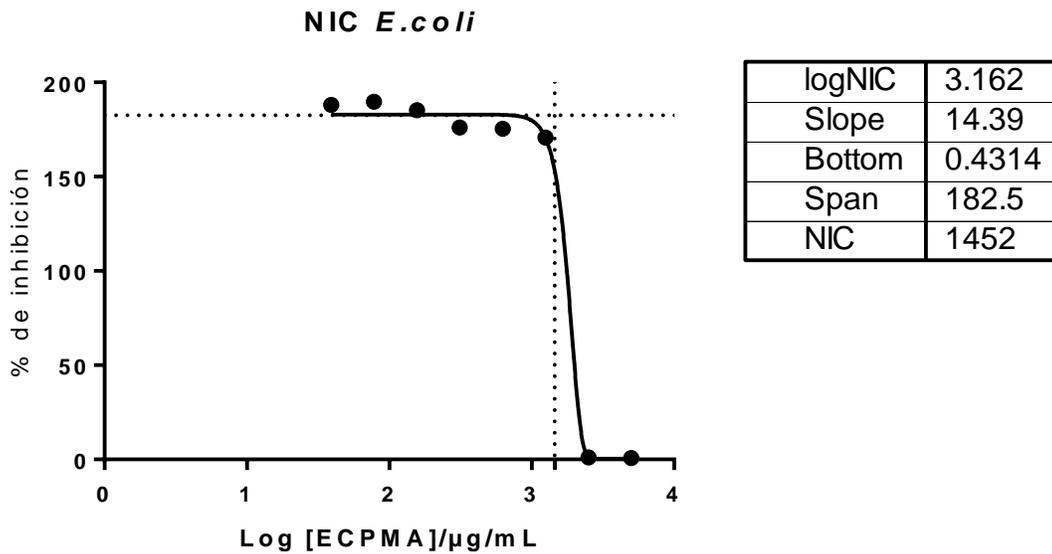


Figura 22: NIC del ECPMA vs *E. coli* obtenido por métodos estadísticos.

4.6.3 Determinación de la actividad bactericida

Con el fin de elucidar el tipo de actividad antibacteriana se procedió a tomar 50 μL de los tubos en los cuales no se apreció visualmente crecimiento bacteriano. Para *S. aureus* se tomaron los tubos que albergaron concentraciones del ECPMA de 3200 y 1600 $\mu\text{g/mL}$ y para *E. coli* de 5000 y 2500 $\mu\text{g/mL}$. Para que exista una actividad bactericida se debe de erradicar en un 99.9% a la bacteria. En primera instancia se procedió a diluir 1000 veces el inóculo de inicio (5×10^5) y se diseminó 50 μL en medio sólido. Seguidamente, después de 24 horas se procedió a contar y comparar el número de colonias que crecieron en el control con las que crecieron en presencia del antibiótico. Si el número de colonias que crecieron en el medio sólido (muestras) fueron las mismas o menores a las contadas en el control se dice que posee actividad antibacteriana del tipo bactericida.

Tal y como se aprecia en las figuras 23 y 24 el ECPMA posee actividad antibacteriana del tipo bactericida tanto para *S. aureus* como para *E. coli*. Para *S. aureus* se puede apreciar únicamente una colonia en el medio sólido correspondiente al tratamiento con 3200 $\mu\text{g/mL}$ (figura 23 B) y ni una colonia con el tratamiento de 1600 $\mu\text{g/mL}$ (figura 23 C).

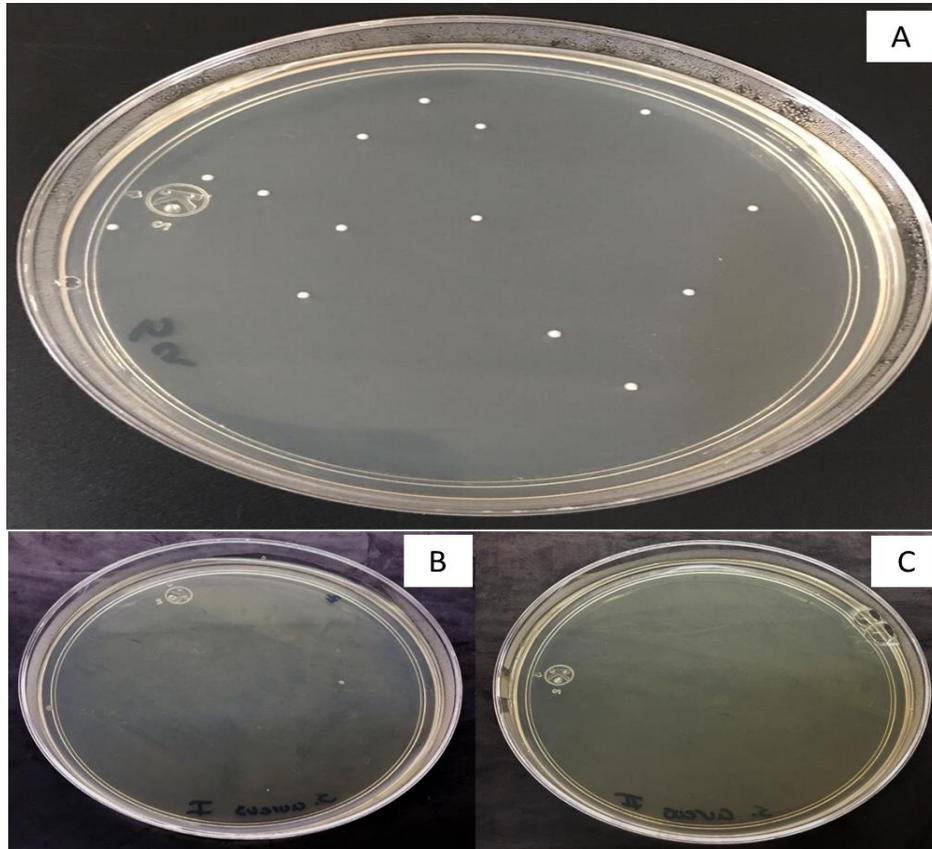


Figura 23: Determinación de la actividad bactericida del ECPMA vs *S. aureus* mediante conteo de colonias. Control diluido 1000 veces (A). Tratamientos de 3200 y 1600 µg/mL (B y C respectivamente).

Para *E. coli* se pudo apreciar únicamente una colonia para el tratamiento con 5000 µg/mL (figura 24 B) y ni una colonia con el tratamiento con 2500 µg/mL (figura 24 C).

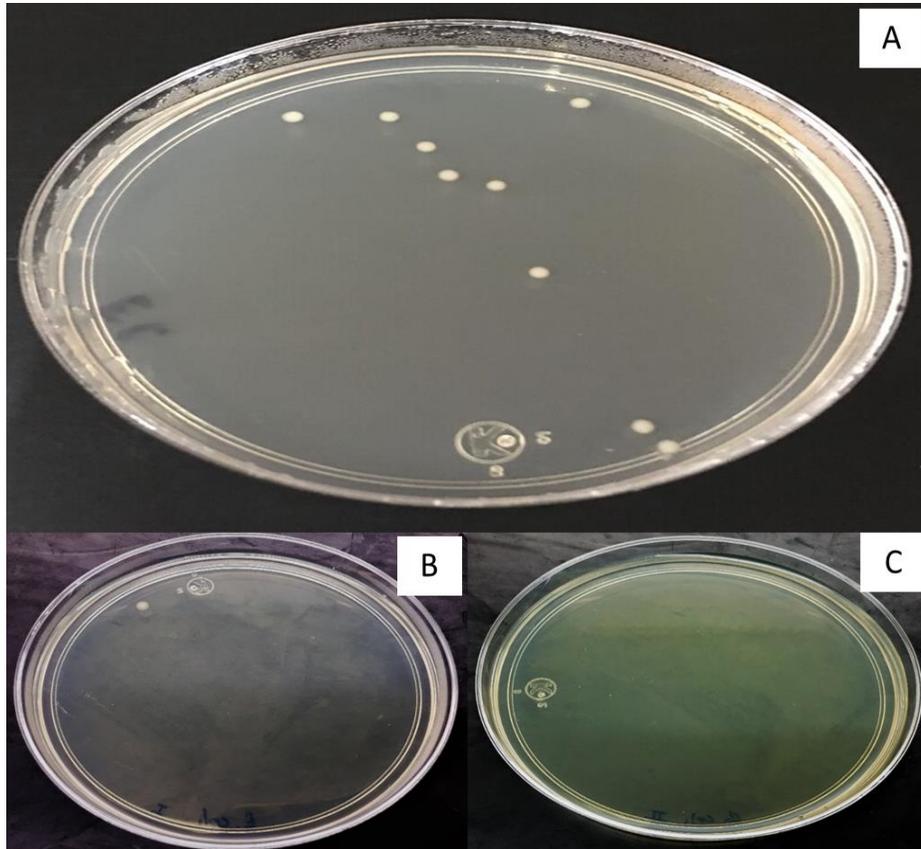


Figura 24: Determinación de la actividad bactericida del ECPMA vs *E. coli* mediante conteo de colonias. Control diluido 1000 veces (A). Tratamientos de 5000 y 2500 µg/mL (B y C respectivamente).

Con lo dicho anteriormente, se puede mencionar que el extracto crudo proteico de la miel de *Apis mellifera* posee actividad antimicrobiana del tipo bactericida contra las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* 25922. Para estas actividades se requirieron cantidades considerables de proteína para que estas mantuvieran un efecto sobre las bacterias. Tal y como se había discutido anteriormente es posible que gran parte de las proteínas presentes en el extracto

no posean la propiedad de agente antibacteriano y la proteína (s) que posee esta actividad se encuentre en bajas concentraciones.

Existen trabajos los cuales evalúan la actividad antimicrobiana de mieles de *Apis mellifera* de diferentes regiones, pero no de sus extractos proteicos, por lo cual, este es el primero en su tipo. El único trabajo el cual se asemeja es el realizado por Kathireswari y colaboradores (2014) los cuales evaluaron el potencial antimicrobiano del extracto proteico de la miel *Apis cerana* proveniente de la India. Estos autores mencionan que estas proteínas poseen actividad antimicrobiana contra cuatro bacterias patógenas, incluyendo *E. coli*. De igual forma, para conocer que proteínas poseen esta actividad se realizó un fraccionamiento proteico, dando como resultado dos fracciones (menores y mayores a 30 kDa). Finalmente, estos investigadores concluyen que las proteínas menores a 30 kDa son las responsables de esta propiedad biológica.

4.6.4 Determinación de la actividad antimicrobiana de las fracciones (F1-F5) por difusión en disco.

Una vez corroborada la propiedad antimicrobiana del extracto proteico se procedió a fraccionar y a evaluar a las cinco fracciones obtenidas por cromatografía por el método de difusión en disco, recalando que la fracción 1 posee a las proteínas no glicosiladas o menos glicosiladas y la fracción 5 a las proteínas con mayor nivel de glicosilación.

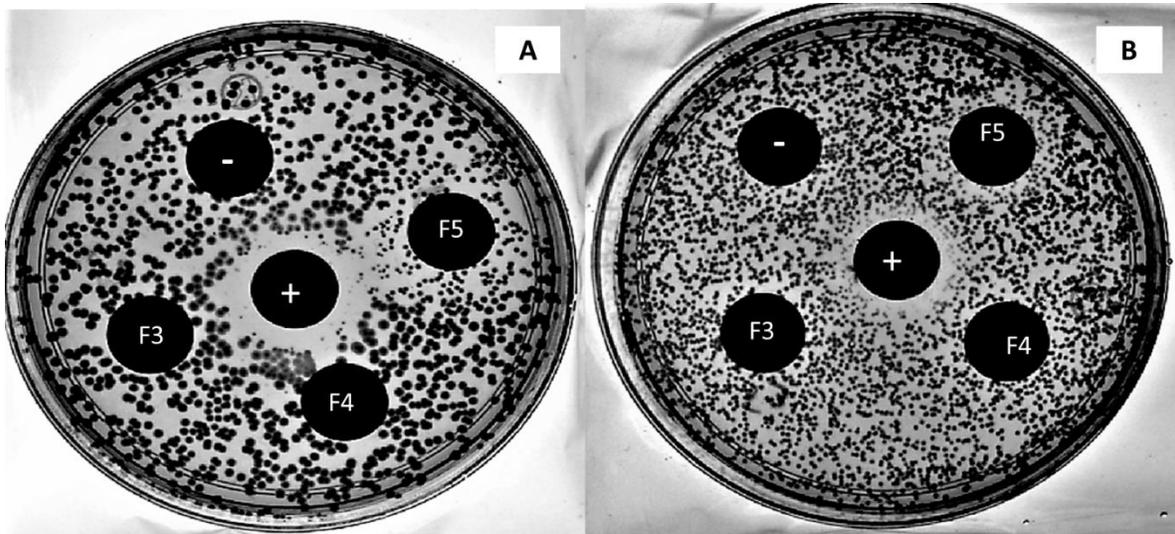


Figura 25: Evaluación de la actividad antimicrobiana de las fracciones 1-5 vs *S. aureus* (A) y *E. coli* (B).

Se pudo observar que únicamente la fracción número 5 ejerció un efecto negativo sobre el crecimiento de ambas bacterias evaluadas (figura 25), no obstante, no se obtuvo una inhibición total pero a simple vista se observó una disminución en el número y el tamaño de las colonias. El que no haya habido una inhibición clara puede ser debido principalmente a dos razones: a la baja cantidad proteica utilizada de la fracción 5; que por cierto fue la más baja de las 5 fracciones con 32 μg , o a la baja difusión en el agar que pudiesen tener las proteínas de gran tamaño presentes en esta misma fracción. Por otra parte, tal y como se había discutido en la sección 4.6.1 para la inhibición de *S. aureus* y *E. coli* se utilizaron 1000 μg , y comparándolo con los 32 μg (3.2% en comparación a lo utilizado con el ECPMA) utilizados en la presente evaluación se puede hacer alusión de que el fraccionamiento del ECPMA

nos ayudó con una purificación parcial de la proteína de interés, la cual es del tipo glicosilada.

Una vez determinada la actividad antimicrobiana de la fracción 5 se procedió a analizar las proteínas presentes con el método SDS PAGE 2D, (figura 26).

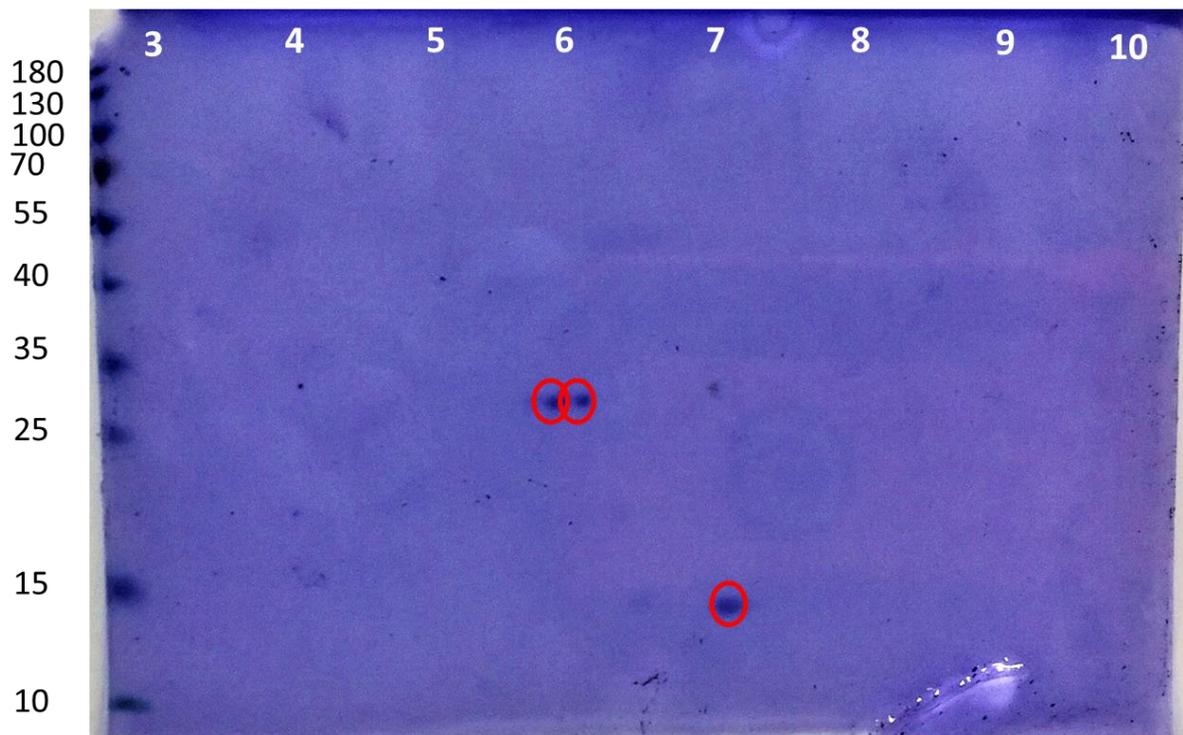


Figura 26: SDS PAGE 2D de la fracción 5.

Tal y como se observa en la figura 26 la fracción 5 mostró un total de 3 proteínas; dos proteínas con pesos moleculares de ~25 kDa con pI de 5.9 y 6.1, las cuales podrían corresponder a fragmentos de la proteína MRJP1, cabe mencionar que estas proteínas se pudieron observar también en el gel correspondiente al extracto proteico. Por otra parte, se puede observar un spot con un peso molecular menor a

15 kDa y con un pI aproximado de 7. El spot previamente mencionado puede ser el principal candidato a albergar a la proteína antimicrobiana

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- El perfil proteico del extracto mostró por SDS-PAGE un total de 14 bandas, mientras que el perfil proteico por SDS-2D mostró al menos 20 bandas. Finalmente, el zimograma reveló la presencia de al menos una proteasa.
- Las proteínas que se pudieron identificar parcialmente en la miel regional de *Apis mellífera* son las MRJP1, 2, 3, 5 y 6, así como a las enzimas glucosa deshidrogenasa, glucosa oxidasa y proteasas.
- El ECPMA y las fracciones 1, 2,3 y 5 fueron capaces de reducir al radical DPPH siendo la fracción 2 la que mejores resultados mostró. Por otra parte, el ECPMA y las fracciones 1-5 fueron capaces de reducir al FeIII, mostrando a la fracción 1 con mejor capacidad antioxidante. Por último, el ECPMA no posee la capacidad quelante.
- El ECPMA tuvo actividad antimicrobiana de tipo bactericida contra *S. aureus* y *E. coli*; teniendo un CMI de 932.3 µg/mL y de 2243 µg/mL respectivamente. Por otra parte, la fracción 5 mostró actividad antimicrobiana contra las cepas evaluadas.

ANEXOS

Anexo 1: Composición del gel apilador al 4% (SDS-PAGE)

GEL APILADOR 4%

ACRILAMIDA 30%	664 µl
BUFFER PH 6.8, 0.5 M	504 µl
AGUA DESTILADA	3.726 ml
SDS 10%	50 µl
PERSULFATO DE AMONIO 10%	50 µl
TEMED	10 µl

Anexo 2: Composición del gel separador al 10 y 12% (SDS-PAGE)

GEL SEPARADOR 10%

GEL SEPARADOR 12%

ACRILAMIDA 30%	4 mL	4.8 mL
BUFFER PH 8.8, 1.5 M	3 mL	3 mL
AGUA DESTILADA	4.8 mL	4 mL
SDS 10%	120 µL	120 µL
PERSULFATO DE AMONIO 10%	60 µL	60 µL
TEMED	10 µL	10 µL

Anexo 3: Composición del gel separador al 8% (Zimograma)

8%

ACRILAMIDA 30%	3.2 ml
BUFFER PH 8.8	3 ml
GELATINA AL 2%	5.6 ml
PERSULFATO DE AMONIO 10%	60 μ L
TEMED	10 μ L

Bibliografías

- Alwan, A., Armstrong, T., Bettcher, D., Branca, F., Chisholm, D., Ezzati, M., & Wild, C. (2011). Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles 2010: Resumen de orientación. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
- Ashmead, H. D. (1991). Comparative intestinal absorption and subsequent metabolism of metal amino acid chelates and inorganic metal salts.
- Beynon, R. J., & Bond, J. (1989). Proteolytic enzymes a practical approach. Oxford: IRL Press Eynsham Oxford England.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brudzynski, K., & Sjaarda, C. (2015). Honey glycoproteins containing antimicrobial peptides, Jelleins of the Major Royal Jelly Protein 1, are responsible for the cell wall lytic and bactericidal activities of honey. *PloS one*, 10(4), e0120238.
- Buttstedt, A., Moritz, R. F., & Eler, S. (2013). Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) as members of the yellow gene family. *Biological reviews*, 89(2), 255-269.
- Carter, P. (1971). Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Analytical biochemistry*, 40(2), 450-458.

- Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J.D., Yan, L.J., Ames, B.N., 1995. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (10), 4337–4341.
- Chua, L. S., Lee, J. Y., & Chan, G. F. (2013). Honey protein extraction and determination by mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(10), 3063-3074.
- Chua, L. S., Lee, J. Y., & Chan, G. F. (2015). Characterization of the proteins in honey. *Analytical letters*, 48(4), 697-709.
- Corrales, L., & Muñoz, M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 135-250.
- Davies, M. J., Dean, R. T., & Davies, D. *Radical-mediated protein oxidation: from chemistry to medicine*. 1997.
- Daza Pérez, R. M. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información terapéutica del sistema nacional de salud*, 22(3), 57-67.
- Di Girolamo, F., D'Amato, A., & Righetti, P. G. (2012). Assessment of the floral origin of honey via proteomic tools. *Journal of Proteomics* 75, 3688–3693.
- Divakar, S. (2013). Glycosidases. In *Enzymatic transformation* (pp. 5-21). Springer India.
- Dolphin, D., Poulson, R., & Avramovic, O. (1989). *Glutathione: Chemical, Biochemical, and Metabolic Aspects, Volumes A and B*.

- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(5), 430-441.
- Ferri, S., Kojima, K., & Sode, K. (2011). Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: a bird's eye view of glucose sensing enzymes.
- Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., & Kobayashi, K. (1990). A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *Journal of biological chemistry*, 265(19), 11333-11337.
- Gershenson, C., & Wisdom, T. (2013). Previniendo enfermedades crónico-degenerativas con vacunas sociales. *Cirugía y Cirujanos*, 83-84.
- Grandjean, M., & Ocampo, S. (2002). *Manual de Buenas Prácticas para la Apicultura*. Santiago de Chile: Fondo Internacional de Desarrollo Apícola.
- Jiménez MA, Román NR, García I. (2011). Antioxidant and antimicrobial activities of hexane extracts and pure compounds from *Aristolochia taliscana* rhizome, *RMCF* 42:35-41
- Kathireswari, P., Karthikeyan, P., & Vennilla, S. (2014). Isolation and partial purification of antibacterial activity protein from Indian honey *Apis cerana indica*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3(8), 614-621.
- Khalil, M. I., Sulaiman, S. A., & Boukraa, L. (2010). Antioxidant properties of honey and its role in preventing health disorder. *The Open Nutraceuticals Journal*, 3(1).

- Kong, F. J., Oyanagi, A., & Komatsu, S. (2010). Cell wall proteome of wheat roots under flooding stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(1), 124-136.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680.
- Lambert, R. J. W., & Pearson, J. (2000). Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of applied microbiology*, 88(5), 784-790.
- Lindsay, D. G., & Astley, S. B. (2002). European research on the functional effects of dietary antioxidants—EUROFEDA. *Molecular Aspects of Medicine*, 23(1), 1-38.
- Lopez, E. (2016). Aislamiento y evaluación de la actividad antimicrobiana de las proteasas presentes en la jalea real de *Apis mellifera*. Tesis profesional.
- Nagai, T., & Inoue, R. (2004). Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food chemistry*, 84(2), 181-186.
- NHB. (09 de 12 de 2016). Honey-Health and Therapeutic Qualities. Obtenido de <http://www.biologiq.nl/UserFiles/Compendium%20Honey%202002.pdf>
- Ortiz-Vazquez, E., Cuevas-Glory, L., Zapata-Baas, G., Martinez-Guevara, J., & Ramon-Sierra, J. (2013). Which bee honey components contribute to its antimicrobial activity? A review. *African Journal of Microbiology Research*, 7(51), 5758-5765.

- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315.
- Qaiyumi, S. (2007). Macro- and Microdilution Methods of Antimicrobial Susceptibility Testing. En R. Schwalbe, L. Steele-Moore, & A. C. Goodwin, *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols* (págs. 75-79). CRC Press.
- Ramón-Sierra, J. M., Ruiz-Ruiz, J. C., & de la Luz Ortiz-Vázquez, E. (2015). Electrophoresis characterisation of protein as a method to establish the entomological origin of stingless bee honeys. *Food chemistry*, 183, 43-48.
- Ramos Ibarra, M. L., Batista González, C. M., Gómez Meda, B. C., & Zamora Pérez, A. L. (2006). Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigación en salud*, 8(1).
- Rossano, R., Larocca, M., Polito, T., Perna, A. M., Padula, M. C., Martelli, G., & Riccio, P. (2012). What are the proteolytic enzymes of honey and what they do tell us? A fingerprint analysis by 2-D zymography of unifloral honeys. *PloS one*, 7(11), e49164.
- Rubio, W. A. (2015). Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos proteicos del fruto de *Bromelia pinguin* L. Tesis profesional.
- Sano, O., Kunikata, T., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda, M., and Kurimoto, M. 2004. Characterization of Royal Jelly Proteins in both Africanized and European Honeybees (*Apis mellifera*) by two-dimensional gel electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.* 52: 15–20.
- Santos, K.S., Dos Santos, L.D., Mendes, M.A., De Souza, B.M., Malaspina, O., and Palma, M.S. 2005. Profiling the proteome complement of the

secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 85–91.

- Scarselli, R., Donadio, E., Giuffrida, M.G., Fortunato, D., Conti, A., Balestreri, E., Felicioli, R., Pinzauti, M., Sabatini, A.G., and Felicioli, A. 2005. Towards royal jelly proteome. *Proteomics* 5: 769–776.
- Schepartz, A. I., & Subers, M. H. (1966). Catalase in honey. *Journal of Apicultural Research*, 5(1), 37-43.
- Schmitzova, J., Kloudiny, J., Albert, S., Schroeder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Judova, J., and Simuth, J. (1998). A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 1020–1030.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(6), 945-948.
- Šimúth, J., Bíliková, K., Kováčová, E., Kuzmová, Z., & Schroder, W. (2004). Immunochemical approach to detection of adulteration in honey: physiologically active royal jelly protein stimulating TNF- α release is a regular component of honey. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(8), 2154-2158.
- Stamler, J.S., Hausladen, A., 1998. Oxidative modifications in nitrosative stress. *Nat. Struct. Biol.* 5 (4), 247–249.
- Wanger, A. (2007). Disk Diffusion Test and Gradient Methodologies. En R. Schwalbe, L. Steele-Moore, & A. C. Goodwin, *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols* (págs. 53-73). CRC Press.

- Won, S. R., Lee, D. C., Ko, S. H., Kim, J. W., & Rhee, H. I. (2008). Honey major protein characterization and its application to adulteration detection. *Food Research International*, 41(10), 952-956.