

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA**

# **TESIS**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA MIEL  
DE *Melipona beecheii* Y DE SU EXTRACTO PROTEICO Y FENÓLICO  
CONTRA *Listeria monocytogenes* ATCC 15313”**

PARA OPTAR AL GRADO DE:

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

PRESENTA:

**QFB. GILBERTO ALVARADO FARJAT**

ASESORES:

**DR. DENIS ISRAEL MAGAÑA ORTIZ**

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

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO.

06 DE ABRIL DE 2017



DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.  
No. DE OFICIO: X-112/2017

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

MÉRIDA, YUCATÁN A 14 DE MARZO DE 2017

C. GILBERTO ALVARADO FARJAT  
PASANTE DE MAESTRIA EN CIENCIAS DE LOS  
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

De acuerdo al fallo emitido por su asesor el Dr. Denis Israel Magaña Ortiz, su coasesor la Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez y la comisión revisora integrada por el Dr. Jesús Alejandro Yam Puc y el M.C. Jesús Manuel Ramón Sierra, 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:

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA MIEL DE *Melipona beecheii* Y DE SU EXTRACTO  
PROTEICO Y FENÓLICO CONTRA *LISTERIA monocytogenes* ATCC15313”

ATENTAMENTE  
IN HOC SIGNO VINCES

  
DR. DANIEL ARCANGEL LÓPEZ SAURI  
ENCARGADO DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Archivo  
DALs/fjaa.



S.E.P.  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE MÉRIDA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



## DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a Dios quién me dio fortalezas y esperanzas de seguir y sobre todo no claudicar en el objetivo planteado a pesar de adversidades presentadas.

A toda mi familia (abuelos, tíos, primos) y amigos ya que me han brindado consejos durante mi vida y gracias a ellos soy la persona que soy.

A mi abuelita Estela quién siempre ha estado pendiente de mí en todo momento y siempre me ha brindado su entera confianza y cariño.

A mis padres quiénes han hecho que sea un hombre honesto, leal, comprometido y con convicciones de ser mejor en todo lo que emprenda y sobre todo por brindarme la educación que hoy en día tengo.

A mis hermanos que siempre están pendientes de mí y me apoyan de manera incondicional

A mis compadres Mariel, David y mí ahijada Dariel quienes me han incentivado a culminar la maestría y orientarme a realizar nuevos proyectos

En especial a mi novia Yahaira quién me ha apoyado en todo momento y cuando he necesitado aliento para continuar ahí ha estado para que no claudique y siga con convicción mis ideales; ayudándome a ser una mejor persona en todos los ámbitos.

## **AGRADECIMIENTOS**

De manera muy especial quiero agradecer este trabajo a mi director de tesis, el Dr. Denis Israel Magaña Ortiz por confiar en mi para el desarrollo del proyecto, de igual manera por la paciencia, sus consejos y orientarme cuando lo necesitaba pero sobre todo gracias por la amistad brindada.

Agradezco de todo corazón a la Dra. Elizabeth de la Luz Ortíz Vázquez el haberme brindado la oportunidad de formar parte del laboratorio de Microbiología Aplicada y Molecular, ser parte de su equipo de trabajo, hacerme sentir de su familia y lo más importante por su amistad y consejos.

Agradezco a los miembros que integran el comité tutorial, el Dr. Jesús Alejandro Yam Puc y el M. C. Jesús Manuel Ramón Sierra quienes realizaron aportes importantes a la tesis y de igual manera me brindaron su amistad.

A mi familia, por su apoyo incondicional en todo momento y siempre dándome alientos para ser mejor.

A mis compañeros de laboratorio que me brindaron su confianza, amistad, experiencia y que siempre estuvieron dispuestos a apoyar cuando lo necesité (Nidia Hau, Rubiel Dzib, Luis Pool, Roberto Amezquita, Keith Rosado, Jair González, Ezequiel López y Harumi Sansores).

En especial agradecer a Janeth Lara y Mónica Morales quienes fueron mi equipo de laboratorio y siempre nos apoyamos de manera incondicional; formando una gran amistad.

Agradecer a CONACYT por la beca otorgada para realizar los estudios de posgrado.

## ÍNDICE GENERAL

	PÁG
ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
RESUMEN	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 La miel de <i>Melipona beechei</i>	3
2.2 Mecanismos asociados con la actividad antibacteriana de la miel	9
2.3 Estrés a los microorganismos debido a la osmolaridad	10
2.4 Acidez y pH de la miel como agente antimicrobiano	10
2.5 Inhibición de los microorganismos debido al peróxido de hidrógeno	11
2.6 Interacción de los compuestos fenólicos contra los microorganismos	13
2.7 Interacción de los compuestos proteicos contra los microorganismos	18
2.8 El género <i>Listeria monocytogenes</i>	24

2.9	Epidemiología y manifestaciones de <i>Listeria monocytogenes</i>	27
2.10	Factores de patogenicidad de <i>Listeria monocytogenes</i>	29
2.11	Resistencia antimicrobiana de <i>Listeria monocytogenes</i>	37
3.	Justificación	39
4.	Hipótesis	40
5.	Objetivos	40
5.1	Objetivo general	40
5.2	Objetivos específicos	41
6.	Materiales y métodos	42
6.1	Materia prima y microorganismo empleado	42
6.2	Extracción de los componentes fenólicos de la miel de <i>Melipona beecheii</i>	42
6.3	Determinación de contenido fenólico del extracto de la miel de <i>Melipona beecheii</i>	43
6.4	Extracción de los compuestos proteicos de la miel de <i>Melipona beecheii</i>	44
6.5	Determinación de la concentración del extracto proteico de la miel de <i>Melipona beecheii</i>	44
6.6	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto proteico y fenólico de la miel de <i>Melipona beecheii</i> mediante difusión en disco	45

6.7	Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la miel de <i>Melipona beecheii</i> , su extracto fenólico y proteico	46
6.8	Determinación de cinética de muerte de <i>Listeria monocytogenes</i> con la miel de <i>Melipona beecheii</i>	47
6.9	Determinación del porcentaje de inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> con extracto fenólico de la miel de <i>Melipona beecheii</i>	47
6.10	Extracción de ADN genómico de <i>Listeria monocytogenes</i>	48
6.11	Extracción de ARN de <i>Listeria monocytogenes</i>	52
6.12	Análisis de la expresión de los genes de virulencia de <i>Listeria monocytogenes</i> por PCR en tiempo real (qRT-PCR)	54
7.	Resultados y discusiones	57
7.1	Curva de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i>	57
7.2	Cuantificación de la proteína de la miel de <i>Melipona beecheii</i> por el método de Bradford	58
7.3	Determinación del perfil proteico por electroforesis	59
7.4	Cuantificación de los fenoles de la miel de <i>Melipona beecheii</i> por método Folin-Ciocalteu	60
7.5	Determinación de la actividad antimicrobiana de la miel de <i>Melipona beecheii</i> y sus compuestos fenólicos y proteicos mediante difusión en disco	61
7.6	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) mediante microdiluciones	67

7.7	Cinética de muerte de <i>Listeria monocytogenes</i> con miel de <i>Melipona beecheii</i> y porcentaje de muerte con el extracto fenólico	69
7.8	Extracción de ADN genómico de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 y detección de genes housekeeping y genes de virulencia	71
7.9	Extracción de ARN de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313 y detección de los genes housekeeping y de virulencia	80
7.10	Variación de la expresión génica de los genes de virulencia con tratamiento de miel y compuestos fenólicos de <i>Melipona beecheii</i>	83
8.	Conclusiones	90
9.	Perspectivas	92
10.	Referencias	94



## **INDÍCE DE TABLAS**

<b>Tabla 1. Oligos diseñados para reacciones de ADN de los genes housekeeping y de virulencia de Listeria monocytogenes</b>	<b>50</b>
<b>Tabla 2. Oligos diseñados para reacciones de ADNc de los genes housekeeping y de virulencia de Listeria monocytogenes</b>	<b>55</b>
<b>Tabla 3. Genes housekeeping y de virulencia especificando su uso, función biológica y tamaño esperado de amplificación</b>	<b>72</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Abeja melipona recolectando néctar de una flor	4
Figura 2. Distribución geográfica de melipónidos	5
Figura 3. Comparación entre abeja <i>Apis mellifera</i> y <i>Melipona beecheii</i>	6
Figura 4. Anatomía de la abeja melipona	7
Figura 5. Estructura química de compuestos fenólicos simples	13
Figura 6. Mecanismo de péptido modelo de barril	21
Figura 7. Mecanismo de péptido modelo de alfombra	22
Figura 8. Mecanismo de péptido modelo poro toroidal	23
Figura 9. Interacción de InIA con E-cadherina	31
Figura 10. Interacción de InIB-célula de huésped	33
Figura 11. Curva de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 en medio LB	57
Figura 12. Curva estándar de BSA para la cuantificación por el método de Bradford	58
Figura 13. Perfil proteico de la miel de <i>Melipona beecheii</i> en gel de poliacrilamida al 12% con una concentración de proteína de 2 $\mu\text{g}$	60
Figura 14. Actividad antimicrobiana de la miel de <i>Melipona</i>	63

**beecheii contra *L. monocytogenes* 15313**

**Figura 15. Actividad antimicrobiana del extracto proteico y 64**

**fenólico de la miel de *Melipona beecheii* contra *L.***

***monocytogenes* 15313**

**Figura 16. Concentración mínima inhibitoria para *L.* 68**

***monocytogenes* 15313 de la miel, el extracto proteico y fenólico**

**de *Melipona beecheii***

**Figura 17. Cinética de muerte de *L. monocytogenes* con miel de 70**

***Melipona beecheii* en concentración 0.5x (8.5% v/v) y 1x (17% v/v)**

**Figura 18. Porcentaje de muerte de *L. monocytogenes* con 71**

**extracto fenólico de miel de *Melipona beecheii* en concentración**

**0.5x, 1x y 2x**

**Figura 19. ADN de *L. monocytogenes* 15313 en gel de agarosa al 72**

**0.8%**

**Figura 20. Genes housekeeping específicos para *L.* 78**

***monocytogenes* ATCC 15313.**

**Figura 21. Genes de virulencia específicos para *L.* 80**

***monocytogenes* ATCC 15313.**

**Figura 22. ARN de *L. monocytogenes* 15313 en gel de agarosa al 81**

**0.8%**

**Figura 23. Detección de genes housekeeping con oligos de 100 82**

**pares de bases a partir de cDNA de *Listeria monocytogenes***

**ATCC 15313.**

**Figura 24. Detección de genes de virulencia con oligos de 100 83**

pares de bases a partir de cDNA de *L. monocytogenes* ATCC 15313

Figura 25. Curva de temperatura de fusión de los genes housekeeping y de virulencia (melt curve). 85

Figura 26. Amplificación de los genes housekeeping y de virulencia para obtener los valores de umbral de ciclo (Ct) 86

Figura 27. Variación de la expresión génica de los genes de virulencia InIA y ActA de *L. monocytogenes* con 3% de miel de *Melipona beecheii* y con 308 µg de extracto fenólico de miel de *Melipona beecheii* 89

## RESUMEN

La listeriosis es una enfermedad invasiva grave que afecta principalmente a mujeres embarazadas, neonatos y adultos inmunocomprometidos. Esta enfermedad tiene una alta tasa de mortalidad (20-30%), y sus complicaciones pueden causar meningitis, septicemia y abortos. *Listeria monocytogenes*, es el agente bacteriano causante de esta infección, y se transmite principalmente a los seres humanos a través de alimentos contaminados. El problema principal hoy en día es que los microorganismos han adquirido resistencia a varios antibióticos y por esta razón los próximos brotes podrían ser difíciles de controlar. Una alternativa con potencial para controlar los patógenos resistentes a los antibióticos es la miel. En la cultura maya los usos de la miel de Melipona son diversos, se utiliza principalmente para tratar trastornos de los sistemas respiratorio, digestivo, circulatorio e inmunológico. Estudios han demostrado que la miel de Melipona es capaz de inhibir el crecimiento de patógenos importantes como *E. coli* y *S. aureus*. El objetivo principal de esta tesis fue determinar la capacidad antimicrobiana de la miel y sus componentes contra *L. monocytogenes* ATCC 15313. El extracto fenólico (EF) de la miel de Melipona se obtuvo utilizando una columna Amberlita XAD-2. Asimismo, se obtuvo el extracto proteico (EP) empleando buffer de fosfatos. La actividad antimicrobiana y la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la miel de Melipona, EF y EP se determinaron por los métodos de difusión de disco y microdilución. Por otra parte, los cebadores fueron diseñados y probados para detectar la presencia de los genes de virulencia de *L. monocytogenes*. Los resultados mostraron que la miel de Melipona, EF y EP pueden inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* con concentraciones superiores al 40%, 620 µg y 80 µg, respectivamente. Las CMI de

miel de Melipona, EF y EP contra *L. monocytogenes* fueron 17%, 591 µg/mL de EAG y 85 µg/mL, respectivamente. Por medio de PCR en tiempo real se determinó que la miel de *Melipona beecheii* al 3% (v/v) reprime el gen *InlA* el cual se encuentra severamente involucrado en la patogenicidad de la bacteria.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) ocurren por el consumo de alimentos contaminados, incluyendo el agua, que contiene una cantidad de microorganismos infecciosos (bacterias, virus, hongos, parásitos) capaces de afectar la salud. Los principales síntomas causados por las ETA son diarrea y vómitos, sin embargo, se pueden presentar infecciones más graves como es el caso de hepatitis, sepsis y meningoencefalitis (Flores, 2005).

Las ETA debido a su grave incremento de incidencia se han convertido en un gran problema de salud pública en el mundo debido al surgimiento de nuevas maneras de transmisión, grupos poblacionales vulnerables y el impacto en la economía que estas generan. La incidencia de las ETA se podría catalogar como indicador directo de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos; esto debido a que se ha comprobado que la contaminación puede ocurrir desde su producción (Flores, 2005).

Uno de los principales microorganismos causantes de estas dolencias es *Listeria monocytogenes* el cual es un bacilo Gram positivo encontrado con frecuencia en el medio ambiente que provoca muertes fetales y meningoencefalitis en una amplia variedad de animales (Gray et al, 1966). La enfermedad en humanos debida a *L. monocytogenes* por lo general ocurre durante el embarazo, la inmunosupresión, o en personas de la tercera edad. Durante la década de 1980, la investigación de varias epidemias de listeriosis confirmó que la transmisión de *L. monocytogenes* en alimentos provoca padecimientos severos como la meningitis, septicemias y abortos; afecta principalmente a personas inmunocomprometidas e inmunodeficientes, así como a embarazadas, ancianos y niños (Zunabovic et al, 2011). A pesar de que *L. monocytogenes* logra infectar por diversas vías (fecal-oral, animal-hombre y madre-

feto), la principal vía de transmisión de este microorganismo es a través de los alimentos contaminados (Posfay et al, 2009). Esta bacteria transmitida por los alimentos es reconocida como causante tanto de brotes esporádicos como de epidemias (Bille, 1990).

Una alternativa para combatir las infecciones gastrointestinales causadas por *L. monocytogenes* es la miel de *Melipona beecheii* ya que diversos estudios han demostrado que esta miel tiene propiedades para combatir bacterias que se encuentran relacionadas con alimentos contaminados como es el caso de *E. coli* y *S. aureus*. (Chan-Rodríguez et al, 2012)



## 2. Antecedentes

### 2.1 La miel de *Melipona beecheii*

La miel proviene de la transformación del néctar de las flores, el cual es transportado por la abeja a través de su estómago y sirve como alimento a las abejas y sus crías (Fonte et al, 2013).

La miel está compuesta principalmente de azúcares, entre los que destacan fructosa y glucosa, también, hay presencia de otras sustancias como ácidos orgánicos, enzimas y partículas sólidas provenientes de la recolección. La miel varía de color, desde casi incoloro a un pardo oscuro. La consistencia también varía ya que puede estar fluida, viscosa o semi cristalizada. El sabor y el aroma varían, pero este depende de la planta de origen de la cual provenga la miel (Codex Stan 12-1981).

La miel de *Melipona* proviene de una abeja sin aguijón, la cual es conocida como *Melipona beecheii*; es un producto que se conoce desde civilizaciones antiguas como es el caso de los “Mayas”; desde entonces ha sido consumido de manera tradicional, además se le ha atribuido diferentes usos en la medicina; sin embargo, la miel de *Melipona* no se encuentra incluida en el estándar internacional de miel y por lo tanto las autoridades de los alimentos no tienen un control de esta miel como lo hay con la miel de *Apis mellifera* (Sousa et al, 2006).

Se considera que el contenido de agua presente en la miel sirve como indicador de pureza; de igual manera del grado de madurez y su estabilidad en el almacenamiento. La acidez libre sirve de indicador de frescura ya que indica si la miel ha sufrido un proceso de fermentación (Fonte et al, 2013)

La miel de Melipona ha sido utilizada en la medicina tradicional de diversos países tal es el caso de Costa Rica, Argentina, Colombia, Guatemala y México. Se ha utilizado contra padecimientos oculares (conjuntivitis y cataratas), infecciones de vías respiratorias (asma bronquial), afecciones digestivas (úlceras), heridas en piel y contra infecciones de vías urinarias; debido a estas propiedades la miel es un producto muy valorado en las farmacias naturistas (Fonte et al, 2013).



Figura 1. Abeja melipona recolectando néctar de una flor (<http://jornadabc.mx/tijuana/24-05-2015/la-milenaria-abeja-melipona-en-peligro-de-extincion>)

Asimismo, las Meliponas o abejas sin aguijón se les llama colectivamente a varias especies de himenópteros incluidos los géneros *Melipona*, *Scaptotrigona*, *Tetragonisca*, *Plebeia*, entre otras especies que comparten características similares (Sousa et al., 2006). Estas abejas se desarrollan en colmenas perennes en las regiones tropicales y subtropicales y producen una miel especial, muy apreciada por sus cualidades curativas y nutricionales (Nates-Parra et al, 2009). También se les conoce como “abejas de los mayas” porque hay evidencia que ellos iniciaron su

domesticación y las criaban en chozas especiales con numerosos troncos (jobones) que servían de colmenas (Enríquez et al, 2004).



Figura 2. Distribución geográfica de melipónidos (Martínez, 2011)

Las abejas sin aguijón se ubican para su clasificación taxonómica dentro de la familia *Apidae*, subfamilia *Apinae* y tribu *Meliponini*. Una característica ampliamente notoria de este grupo de abejas comparado con las melíferas, es la gran variedad de especies que difieren no sólo en morfología sino también en hábitos de anidación y de alimentación, dentro de una comunidad existen especies que ocupan nichos ecológicos distintos para evitar competencia entre ellas. (Euán, 2005).

La característica principal de las meliponas es la ausencia de un aguijón funcional, es decir, las obreras y reinas sólo poseen vestigios de lo que en el pasado fue el aguijón. También poseen una estructura pilosa en forma de cepillo en el extremo más ancho de la tibia, que se conoce como penicillium y en comparación con todos

los otros grupos de abejas, la venación en sus alas es débil, con algunas venas muy tenues o completamente ausentes (Euán, 2005).

A continuación, se señalan los puntos que caracterizan taxonómicamente las abejas sin aguijón:

- a) Gran reducción de la venación de las alas anteriores.
- b) Falta de aguijón.
- c) Uñas simples, no bifurcadas.
- d) Presenta una línea de pelos gruesos a modo de peine en el margen distal interno de las tibias posteriores llamado penicillium.
- e) El basitarso carece de aurícula (patas sin vellos) (Euán, 2005).



Figura 3. Comparación entre abeja *Apis mellifera* (lado izquierdo) y *Melipona beecheii* (lado derecho)

De manera general, por sus características anatómicas y de conducta, se pueden dividir a los meliponinos en dos grandes grupos, el de las meliponas y el de las trigonas. Esta división no es taxonómica. Algunas características que dividen a ambos grupos son las siguientes:

En el grupo de las meliponas, principalmente está dado por abejas de dimensiones corporales de alrededor de un centímetro; son abejas robustas con mucha pilosidad en el cuerpo. Las alas anteriores son cortas y no rebasan la longitud total del cuerpo. En contraste, el grupo de las trigonas las abejas son pequeñas, con géneros como *Trigonisca* y *Plebeia* que incluye algunas de las abejas más pequeñas del mundo. Son de estructura aerodinámica y el cuerpo es alargado, brillante, con muy poco pelo. Las alas posteriores sobrepasan la longitud del abdomen. Por otra parte, en las meliponas las reinas vírgenes son de menor tamaño que las obreras y sus ovarios no se encuentran aún desarrollados cuando emergen de las celdas. En las trigonas las celdas reales son de mayor tamaño que las obreras y el desarrollo ovárico es mayor en las reinas vírgenes cuando emergen de sus celdas (Euán, 2005).

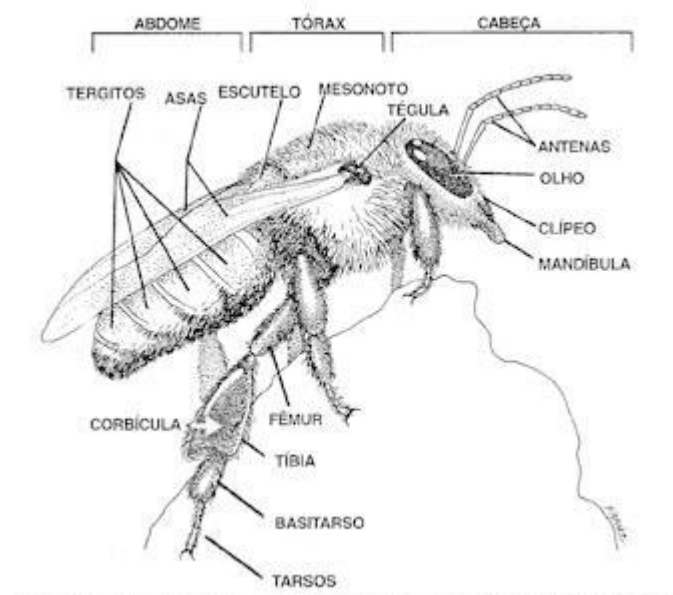


Figura 4. Anatomía de abeja melipona (Nogueira Neto, 1997)

La miel de melipona al compararse con la de la abeja melífera se observa que esta tiende a ser menos viscosa, más ácida y la composición no es la misma; esta última característica podría estar implicada en el efecto que ejerce sobre distintos

microorganismos patógenos. Una diferencia entre las meliponas y las melíferas es que visitan diferentes especies de plantas. La alta humedad favorece la formación de cierta cantidad de peróxido de hidrógeno y de ácido glucónico, el peróxido de hidrógeno es un compuesto que ha demostrado poder antimicrobiano (Zamora et al, 2011).

Las civilizaciones mesoamericanas utilizaban la miel de la melipona con fines comerciales, rituales y medicinales; sin embargo, son pocos los estudios que se han realizado con base científica. Se ha determinado que en muestras de miel de *M. beecheii*, los valores de pH fueron aproximadamente de 4.5; los contenidos de acidez, de 28 meq/kg; la humedad, de 24 %; y la conductividad eléctrica, de 0,551 mS/cm; mientras que el Hidroximetilfurfural (HMF) fue de 64,79 mg/kg (Grajales et al, 2001).

No obstante, la abeja *Melipona beecheii* nativa de Yucatán, ha sido desplazada por la abeja europea debido a la mayor producción de miel que esta especie presenta (Zamora et al, 2011). Por lo que en los últimos años se han realizados diversos estudios que han demostrado que la miel de Melipona tiene propiedades para combatir bacterias que causan enfermedades gastrointestinales con mayor efectividad que la miel de Apis (Chan-Rodríguez et al, 2012).

Entre los alimentos que poseen la característica de “funcional” se puede incluir todo aquello que se genera en la colmena como la miel, polen y la jalea real. La miel en muchas culturas forma parte de la medicina tradicional (Gómez-Caravaca et al., 2006), aunque su principal uso es como edulcorante debido a que es una solución sobresaturada en azúcares, principalmente de fructosa (38%) y glucosa (31%) (Gheldof et al., 2002). Además, la miel contiene una gran variedad de componentes

como flavonoides, ácidos fenólicos, enzimas, ácido ascórbico, carotenoides, ácidos orgánicos, aminoácidos y proteínas (Ferrerres et al., 1993).

## **2.2 Mecanismos asociados con actividad antibacteriana de la miel**

Una de las principales actividades que le atribuyen a la miel de *Melipona* es su capacidad de inhibir el crecimiento de ciertos patógenos, esta actividad se le atribuye a diversos factores como: 1) efectos osmóticos, debido a la alta osmolaridad concentración de azúcares de la miel el equilibrio del agua en el interior y exterior de la célula se ve afectada, reduciendo su capacidad de sobrevivir; 2) la acidez, como la miel es ácida con un valor de pH entre 3.2 y 4.9 lo cual puede inhibir el crecimiento de muchos patógenos cuyo pH de crecimiento óptimo no es ácido; 3) peróxido de hidrógeno, que se produce en la miel debido a la conversión de glucosa a ácido glucónico por la glucosa oxidasa, una enzima producida por la glándula de la hipofaringe de las abejas; 4) factores fitoquímicos, factores antibacterianos que ejercen los diversos fenoles complejos y ácidos orgánicos a menudo referidos como flavonoides. Estos últimos compuestos complejos no se degradan fácilmente bajo el tratamiento de calor o la luz y proporcionan actividad antibacteriana (Manyi et al, 2011. Temaru et al, 2007). 5) Proteínas y péptidos antimicrobianos, los cuales se presume que pudieran interactuar con la pared celular de las bacterias, uniéndose a intermediarios de la formación de péptidoglicano (Epanand y Vogel, 1999), también se ha sugerido que estas moléculas de origen proteico interaccionan con el ADN bacteriano, de manera que podrían estar inmersos en la inhibición de ciertos procesos moleculares vitales para la expresión de ciertos genes (Boman et al., 1995).

### **2.3 Estrés a los microorganismos debido a la osmolaridad**

Se ha logrado determinar que la alta osmolaridad de la miel inhibe el crecimiento bacteriano por que las moléculas de glucosa interfieren con el movimiento de las moléculas de agua fuera de la célula por lo tanto el agua que debe transportarse hacia la célula entra de manera más lenta. Las moléculas de agua en el interior no se ven afectadas y pasan fuera de la célula de manera normal. Por lo tanto, se está sometiendo a la célula a una solución hipertónica y provoca que la célula libere su agua dando lugar a la muerte de la bacteria por deshidratación.

Un estudio realizado por Jenkins et al., 2011 mostró que un 10% miel artificial (v/v) no logra inhibir a la cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, mientras que un 10% de miel de manuka si logró inhibir al microorganismo. La miel artificial consistía en una solución de 4 azúcares (glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa). Aunque el estudio se realizó con las mismas concentraciones de azúcar (10%) tanto de la miel artificial como la de manuka; la miel artificial no muestra inhibición bacteriana y la de manuka si logró inhibir al microorganismo lo cual nos indica que el azúcar en la miel no es el responsable de la actividad antimicrobiana, este efecto puede ser debido a otros compuestos presentes en la miel.

### **2.4 Acidez y pH de la miel como agente antimicrobiano**

La acidez de la miel tiene un rol importante en la prevención del crecimiento de bacterias. De acuerdo a Vit et al, (2004), la miel de abejas sin aguijón como la de *Melipona*, *Scaptotrigona* y *Trigona* son más ácidas que la miel de *Apis mellifera* con



valores que oscilan en 70 a 85 meq de ácido láctico/100 g de miel; mientras que la de *A. mellifera* presenta una acidez de 40 meq/100 g de miel. La miel presenta un pH entre 3.2 y 4.4, esto se debe a la presencia de diferentes ácidos orgánicos, los cuales se forman a partir de la glucosa presente en la miel dando lugar a peróxido de hidrógeno y ácido glucónico por la glucosa oxidasa (Kwakman et al, 2010).

Dardón (2008) realizó un estudio donde evaluó la actividad antimicrobiana de 9 especies de abejas sin aguijón (*Geotrigona acapulconis*, *Melipona beecheii*, *Melipona solani*, *Melipona aff. yucatanica*, *Nannotrigona perilampoides*, *Plebeia sp.*, *Scaptotrigona mexicana*, *Tetragonisca angustula*) contra 8 bacterias Gram positivas y Gram negativas, y levaduras. Los valores de pH oscilaron entre 3.6 y 5.18. Todas las mieles mostraron actividad antimicrobiana con concentraciones mínimas inhibitorias entre 2.5 a 10% (v/v). En otro estudio, Kwapong et al, (2013) comparó la actividad antimicrobiana de miel de Spinola de *Melipona boncadei* y estándares de antibióticos contra patógenos que comúnmente afecta los ojos. El pH de la miel sin diluir (100%) fue de 3.8. Esta miel mostró tener actividad antimicrobiana contra *S. epidermidis*, *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*; resultando ser más susceptibles los microorganismos Gram positivos que los Gram negativos.

## **2.5 Inhibición de los microorganismos debido al peróxido de hidrógeno**

Existen varias investigaciones que sostienen que el mayor efecto antibacteriano de la miel es debido al peróxido de hidrógeno (Temaru et al., 2007). Las abejas agregan una enzima llamada glucosa oxidasa al recolectar el néctar, durante ese proceso la

glucosa de la miel es convertida en peróxido de hidrógeno y ácido glucónico. Los niveles de peróxido de hidrógeno en miel son determinados entre el nivel de producción y su destrucción mediante catalasas. La enzima glucosa oxidasa se encuentra en todo tipo de mieles, pero su concentración difiere de miel a miel dependiendo de la edad y la salud de la abeja, así como también de la variedad de plantas donde la abeja pecoree (Alaux et al, 2010). Las catalasas provienen del polen, estas catalasas se encarga de hidrolizar el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. La concentración de catalasa depende de la cantidad de granos de polen presentes en la miel y como consecuencia la presencia de peróxido de hidrógeno varía en la miel (Brudzynski et al, 2011).

El mecanismo del peróxido de hidrógeno ocurre mediante la destrucción de radicales libres de hidroxilo que pueden atacar la membrana lipídica, ADN, y otro tipo de componentes celulares vitales para el microorganismo (Brudzynski et al, 2011). Durante la maduración de la miel la glucosa oxidasa es inactivada sin embargo la actividad de la enzima se puede recuperar si la miel es diluida ya que la glucosa en presencia de oxígeno y agua con la enzima glucosa oxidasa reacciona y se produce ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (Kwakman et al, 2010).

Kwakman et al, (2010) realizó un estudio donde encontró que la miel de Revamil (presentación farmacéutica) que producía  $3.47 \pm 0.25$  mM peróxido de hidrógeno en un 40% (v/v) de miel después de 24 horas; sin embargo, el peróxido de hidrógeno no fue detectado en la prueba que se le realizó a la miel de Manuka. A partir de lo anterior se sugiere que la actividad del peróxido de hidrógeno no es responsable en la actividad antimicrobiana que presenta la miel de Manuka. Otro estudio que realizó Brudzynski et al, (2011) demostró que el peróxido de hidrógeno estuvo implicado en

el daño oxidativo que provoca una inhibición en el crecimiento bacteriano y la degradación del ADN. Sin embargo; la catalasa es producida por los organismos aerobios y anaerobios y puede detener la actividad de peróxido de hidrógeno; la catalasa protege a las células del peróxido de hidrógeno convirtiéndolo en agua y oxígeno.

## 2.6 Interacción de los compuestos fenólicos contra los microorganismos

Los compuestos fenólicos son fitoquímicos con actividad antioxidante que se ha visto que pueden mostrar un comportamiento pro-oxidante en microorganismos patógenos. Se cree que la toxicidad de los polifenoles a los microorganismos está relacionada con los sitios y número de grupos hidroxilo que tiene (Das et al, 2010).

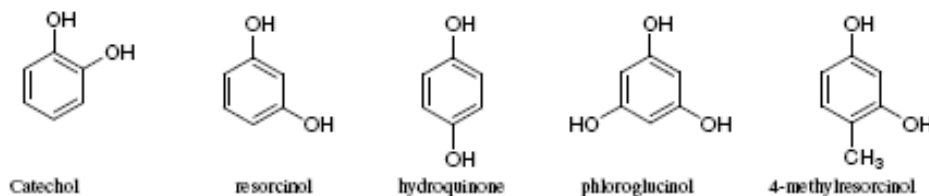


Figura 5. Estructura química de compuestos fenólicos simples (Peñarrieta et al, 2014).

Martínez (2011) logró identificar 7 compuestos fenólicos presentes en la miel de Melipona los cuales son: ácido clorogénico, catequina, ácido cafeico, ácido elálgico, miricetina, quercetina, y apigenina. Estos mismos compuestos han sido detectados en mieles provenientes de Chile, España, Costa Rica, Francia, Malasia y Australia; destacando entre los más comunes la quercetina, kampferol y apigenina; mientras

que el ácido elálgico y miricetina se encuentran en menos proporción en estas mieles.

Además, algunos investigadores han observado que los fenoles altamente oxidados presentan un potencial inhibitorio frente a microorganismos patógenos. De acuerdo con los investigadores, existen varios mecanismos de acción antimicrobianos de fitoquímicos, que todavía no son completamente comprendidos. Se cree que los flavonoides actúan inhibiendo la función de la membrana citoplasmática, mientras que son capaces de cambiar la morfología celular con daño a la formación de células filamentosas (Cushnie and Lamb, 2005). Por otra parte, se ha visto que estos compuestos pueden inhibir la ADN-girasa y  $\beta$ -hidroxiacil (enzima implicada en la oxidación de ácidos grasos) (Paiva et al., 2010).

Es importante señalar que probablemente no haya un único compuesto fenólico responsable de la actividad microbiológica observada, sino también la combinación de compuestos puede mostrar bioactividad cuando ellos interactúan de una manera sinérgica. Además de la actividad antimicrobiana de moléculas antioxidantes, los compuestos antimicrobianos fenólicos pueden ser clasificados como bactericidas, bacteriostáticos y bacteriolíticos en cuanto a la observación de sus efectos en cultivo bacteriano.

Los compuestos bacteriostáticos son inhibidores de síntesis de proteínas y su efecto en la unión en los ribosomas. Si la concentración del compuesto es baja, los compuestos son liberados del ribosoma y el crecimiento se reanuda.

Los compuestos bactericidas penetran la membrana celular adhiriéndose a sitios específicos como proteínas o ácidos nucleicos causando la muerte del microorganismo.

Finalmente, los compuestos bacteriolíticos incluyen a los antibióticos que previenen la síntesis de la pared celular. Debido a que la pared celular y sus mecanismos de síntesis son bastante únicos en la bacteria, los antibióticos tienen mucha selectividad (Madigan et al, 2008).

Da Silva et al, (2013), realizó un estudio de muestras de miel de *Melipona (Michmelia) seminigra merriallae*, las mieles fueron analizadas para determinar su contenido y perfil de compuestos fenólicos, antioxidantes y actividades antimicrobianas. El rango total de contenido fenólico fue de 17 a 66 mg Eq AG/g de extracto. Los contenidos altos se encuentran en la miel producida a partir de abejas que visitan plantas tales como la clidemia y myrcia. La actividad antioxidante fue más alta en las muestras que contienen altas concentraciones de compuestos fenólicos. Los extractos fenólicos muestran actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, y *C. krusei*. Estos autores han identificado catorce compuestos fenólicos en extractos, entre ellos, el flavonoide taxifolin, el cual no había sido previamente descrito en mieles de abejas sin aguijón.

En otro estudio Queiroz Pimentel et al, (2013) evaluó la actividad antimicrobiana en muestras de miel por abejas sin aguijón *Melipona compressipes manaosensis* (estaciones secas y lluviosas). *M. compressipes manaosensis* inhibe el crecimiento de *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella sp.* y *Salmonella paratyphi*. El autor también analizó cromatogramas obtenidos de 290 y

340 nm, y detectó varios picos dentro de la región de flavonoides en las muestras de miel. Sin embargo, los flavonoides pinocembrina y apigenina no fueron identificados en ninguna de las muestras, indicando que estos flavonoides no están presentes en los tipos de miel usados en este estudio.

De acuerdo con Da Silva et al, (2013) la composición fenólica de la miel está relacionada con el origen botánico. Estos autores identificaron 22 tipos de polen en las muestras de miel producidas por *Melipona (Michmelia) seminigra merrillae* recolectada en 7 condados distribuidos en el centro y en el sur de la región del Amazonas en el estado de Brasil. Concluyen que el contenido y diversidad del polen varía con el origen; y esto influye el contenido y diversidad de los compuestos fenólicos.

Los polifenoles, especialmente los flavonoides y los ácidos fenólicos, son conocidos por tener un papel importante como antioxidantes y la miel es considerada como la principal fuente de estos compuestos (Viuda-Martos et al, 2008). La presencia y concentraciones de estos fitoquímicos en la miel pueden variar dependiendo de la fuente floral, y de las condiciones geográficas y climáticas en las que se encuentre. Por consiguiente, los polifenoles se han sugerido como marcadores florales para la autenticación botánica de las mieles monoflorales (Jaganathan y Mandal, 2009).

Todos los polifenoles tienen al menos un grupo hidroxilo unido al anillo aromático de la molécula y son biosintetizados en las plantas por la ruta del shikimato y acetato. En general, a parte de su capacidad de proveer a las plantas con colores, los polifenoles tienen diferentes funciones en las plantas, que incluyen; la capacidad de actuar como antimicrobiano, antifúngico, antioxidante y quelante de metales tóxicos (Gould y Lister, 2005). Además, mucho de los colores, aroma y sabor de los

alimentos vegetales y bebidas, está asociado con la presencia de polifenoles (Bravo, 1998). Conforme a la clasificación de Harborne (1989) la cual agrupa a los fenoles en 10 clases, dependiendo de su estructura química básica, pero en la miel, los ácidos fenólicos y los flavonoides son los más importantes.

Los ácidos fenólicos (benzoico y ácidos cinámico) y flavonoides (flavanonas, flavanoles) contribuyen significativamente a la capacidad terapéutica de miel que varía mucho dependiendo de la fuente floral. Diferentes estudios han demostrado que la miel puede tener efectos antimicrobianos, antiinflamatorios, efectos antioxidantes y potenciación de la respuesta del sistema inmune (Bastos et al, 2011). Los componentes no-peróxidos fitoquímicos de la miel de *Manuka apinae* (después de la eliminación del peróxido de hidrógeno por tratamiento con enzima catalasa) de Nueva Zelanda se ha encontrado que tienen niveles sustanciales de actividad antibacteriana. Esta miel de *Manuka* fue probado contra siete especies de bacterias y se encontró que tenía CMI, que van desde 1,8% a 10,8% (v/v). Este resultado, por lo tanto, indica que el mayor efecto antimicrobiano de la miel puede no ser debido al peróxido de hidrógeno (Brudzynski, 2011). La actividad antibacteriana no-peróxido en la miel se debe principalmente a su contenido polifenólico, azúcar y otros factores recientemente descubiertos. En primer lugar, la actividad antimicrobiana no-peróxido de la miel por abejas sin aguijón (Meliponinae) se ha demostrado como un factor importante, ya que la actividad antibacteriana, debido al peróxido de hidrógeno; se podría reducir por la acción de la catalasa presente en el suero humano (Temaru et al., 2007).

## **2.7 Interacción de los compuestos proteicos contra los microorganismos**

Los péptidos que se encuentran en la naturaleza varían en tamaño desde pequeñas moléculas que contienen dos o tres aminoácidos hasta moléculas muy grandes que contienen miles de ellos y se denominan proteínas (Nelson y Cox, 2009)

Los péptidos antimicrobianos son codificados por genes y de manera natural son la primera línea de defensa del huésped frente a los microorganismos patógenos debido a que son parte de la respuesta inmune innata (Bulet et al, 2004). Generalmente, estos péptidos o polipéptidos, contienen menos de 200 aminoácidos y son producidos por diferentes tipos de células, se expresan de forma constitutiva o inducible dependiendo del organismo y del tejido en el que estén presentes al momento de la infección, y tienen un amplio espectro antimicrobiano y múltiples mecanismos de acción (Hancock, 2006)

El uso y consumo irracional de los antibióticos ha generado que los microorganismos generen mecanismos de resistencia. Esta resistencia ha sido de manera creciente por lo cual es necesario contar con otro tipo de alternativas antimicrobianas seguras. La rápida aparición de infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos se ha convertido en un gran reto, debido a que en los últimos 40 años sólo se han creado 3 nuevas clases de antibióticos (lipopéptidos, oxazolidinonas y estreptograminas) todos para infecciones causadas por Gram positivos. Debido a una alta incidencia por infecciones causadas por Gram negativos aunado a la multirresistencia como es el caso del *S. aureus* meticilinresistente se han generado alternativas como lo son los péptidos catiónicos; los cuales ejercen acción de inhibición contra infecciones de Gram positivos y negativos, protozoarios, virus e inclusive infecciones fúngicas (Marr et al., 2006)



Los péptidos presentan una gran ventaja ya que además de poder ser utilizados como agentes antimicrobianos, también poseen propiedades inmunomoduladoras y de igual manera se ha visto que actúan como neutralizantes de endotoxinas. Además, otra gran ventaja es la capacidad de inhibir patógenos multirresistentes a los antibióticos (Marr et al., 2006)

Los péptidos han demostrado que tienen diferentes blancos celulares bacterianos, debido a que logran atravesar las membranas; tienen un efecto sobre los procesos citoplasmáticos (incluyendo inhibición de síntesis de macromoléculas, enzimas y en la división celular) o bien causan autólisis (Marr et al., 2006).

Los péptidos antimicrobianos tienen una gran diversidad de motivos estructurales. Los cuales se han clasificado en: péptidos lineales anfipáticos, hélices hidrófobas, péptidos cíclicos, pequeñas proteínas con estructura de hoja- $\beta$ , péptidos con composición específica rica en aminoácidos, lipopéptidos y macrocíclicos. Muchos presentan estructuras  $\alpha$ -hélice y la mayoría son catiónicos y anfipáticos, sin embargo, también hay  $\alpha$ -hélice hidrófobos que poseen actividad antimicrobiana. A pesar de la diversidad los péptidos catiónicos presentan una característica muy importante y es que son anfipáticos lo cual les permite interactuar con la membrana celular de las bacterias; además pueden poseer la capacidad de atravesar la membrana para alcanzar un blanco dentro de la célula (Erand y Vogel, 1999).

El objetivo del péptido antimicrobiano es la bicapa lipídica de la membrana celular. Estos péptidos al ser catiónicos interactúan con los fosfolípidos aniónicos, lo cual explica su especificidad por las membranas bacterianas. El péptido antimicrobiano logra inducir la lisis completa del microorganismo al causar una rotura en la membrana celular (Erand y Vogel, 1999).

Los péptidos antimicrobianos con estructura  $\alpha$ -hélice en general son anfipáticos y catiónicos lo cual genera una toxicidad selectiva para los microorganismos patógenos. Uno de los péptidos más estudiados es la magainina, este péptido está constituido de 23 aminoácidos, es secretado en la piel de la rana *Xenopus laevis* y cuenta con un amplio espectro de actividad antimicrobiana (Epanand y Vogel, 1999).

Un ejemplo de un péptido con composición específica en aminoácidos es la histatina que es producido en la saliva y es rico en histidina. Otro tipo de péptidos como los lipopéptidos son caracterizados por contener una alta proporción de residuos ácido- $\alpha$ -amino isobutírico. Estos péptidos están ciclados en el extremo N-terminal, y también presentan un alcohol en el C-terminal; un ejemplo es la alameticina, un metabolito producido por el hongo *Trichoderma polysporum*, forma canales en la membrana a través de la asociación de una hélice (Epanand y Vogel, 1999).

La composición de aminoácidos, anfipaticidad y carga les permite a los péptidos adherirse e insertarse en las bicapas lipídicas de la membrana para formar poro por mecanismos tipo barril, alfombra o toroidal. Los péptidos antimicrobianos primero son atraídos a las superficies bacterianas por atracción electrostática (Brogden et al, 2005).

En cuanto al modelo de barril se ha determinado que las hélices peptídicas forman un haz con un lumen central en la membrana dando lugar a un tipo barril el cual está compuesto de péptidos helicoidales (Fig. 6). Un péptido que tiene este mecanismo es la alameticina, la cual se inserta en las bicapas lipídicas. Las regiones peptídicas hidrófobas se alinean con la región del núcleo de la bicapa lipídica y las regiones peptídicas hidrofílicas forman la parte interior del poro (Brogden et al., 2005).

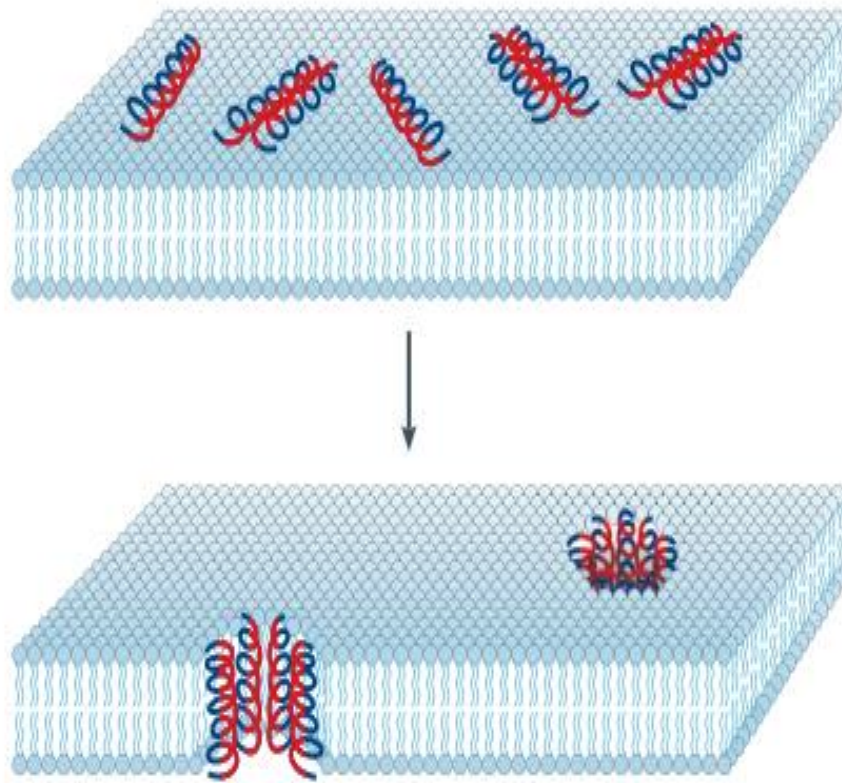


Figura 6. Mecanismo de péptido modelo de barril (Brogden et al., 2005)

Para el modelo alfombra tiene un mecanismo en el cual los péptidos se acumulan sobre la superficie de la bicapa lipídica (Fig. 7). La ovispirina es un péptido que presenta este mecanismo y es atraída por interacciones electrostáticas al fosfolípido aniónico revistiendo la superficie de la bicapa lipídica como una alfombra (Brogden et al., 2005).

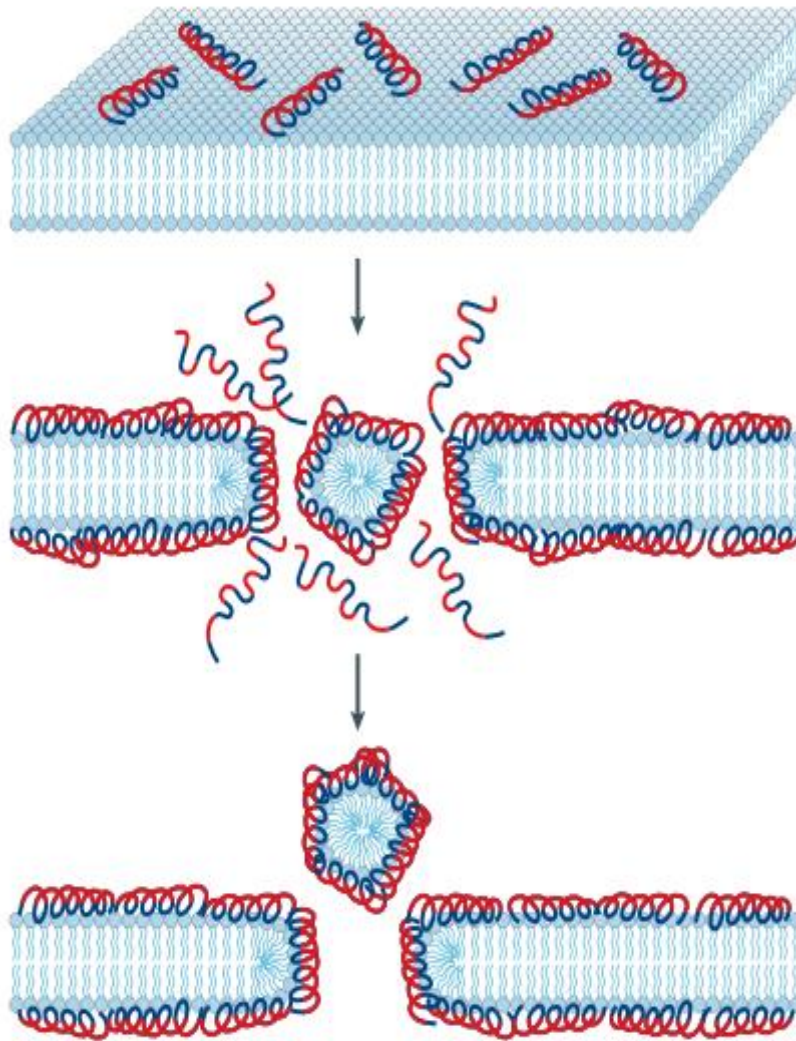


Figura 7. Mecanismo de péptido modelo de alfombra (Brogden et al., 2005).

Mientras que en el modelo de poro toroidal uno de los péptidos que presenta este mecanismo son las magaininas y se insertan sobre la superficie de la membrana provocando que ésta se doble de manera continua dando lugar a una curvatura positiva (Fig. 8). A través del poro los péptidos insertados y los fosfolípidos aniónicos se asocian (Brogden et al., 2005).

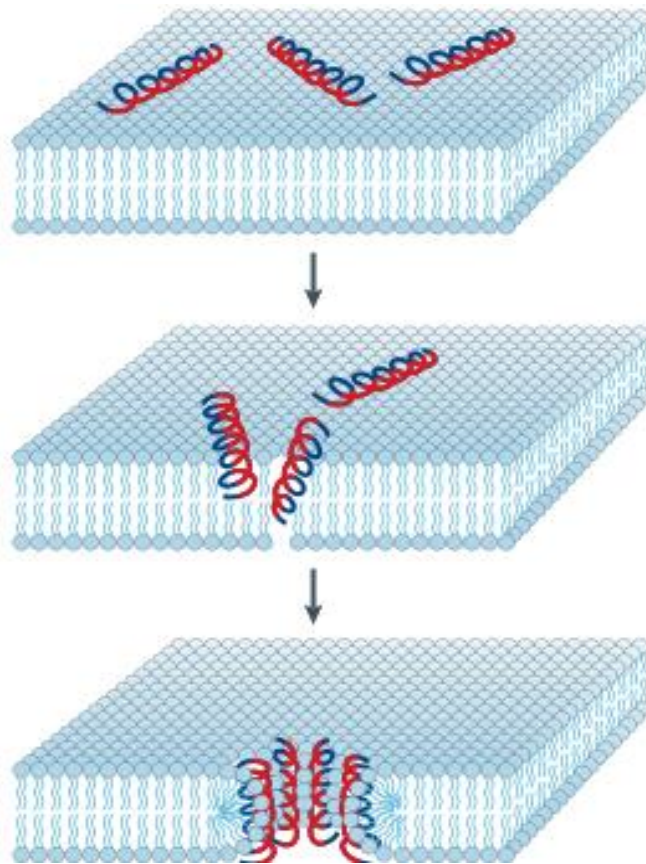


Figura 8. Mecanismo de péptido modelo poro toroidal (Brogden et al., 2005).

A pesar de que la formación de canales iónicos y poros transmembrana causa una ruptura en la membrana celular ocasionando la lisis de los microorganismos, hay estudios de que estos efectos no son los únicos mecanismos de acción. El péptido Buforin II es lineal  $\alpha$ -helicoidal con una prolina; este péptido cruza la membrana citoplasmática y se acumula en el citoplasma, ya en el citoplasma este tipo de péptidos pueden alterar inhibiendo la síntesis de la pared celular, síntesis de ácidos nucleicos, síntesis de proteínas o la actividad enzimática (Brogden et al., 2005).

Los péptidos antimicrobianos presentan 3 desventajas; la primera es su potencial de toxicidad ya que han sido utilizados de manera tópica y no de manera parenteral y oral que es la manera en la que los antibióticos son utilizados de manera cotidiana; aunque la mayoría de los péptidos son activos contra las membranas de procariontas,

parece que tienen menor capacidad de romper membranas eucariotas debido a la ausencia de lípidos aniónicos en la superficie. La segunda desventaja es la labilidad de los péptidos frente a las proteasas, lo cual provoca la degradación del péptido y por lo tanto éste no presentaría actividad. Y el tercero y mayor problema es el alto costo de fabricación y producción de los péptidos; aunque hay una excepción, ya que las bacteriocinas superan estas desventajas debido a que se pueden producir en bacterias por recombinación y fermentación a gran escala; además presentan estructuras inusuales y aminoácidos que hacen ser resistentes a las proteasas (Hancock, 2006).

Péptidos antimicrobianos han sido aislados de abejas de *Apis mellífera* y de la mosquita *Drosophila*; entre los péptidos aislados se encuentran abaecina, apidaecina y royalisina los cuales son miembros de la familia de las defensinas y son considerados péptidos catiónicos con 3 puentes disulfuro, poseen un alto contenido de prolina y estudios han mostrado que estos péptidos son capaces de inhibir bacterias Gram negativas (Montaño, 2002).

Algunos de estos péptidos antimicrobianos como los ya mencionados anteriormente pudieran encontrarse en la miel tanto de melipona como de Apis y pudieran poseer efecto antimicrobiano contra un patógeno altamente involucrado en enfermedades de transmisión alimentaria como lo es *Listeria monocytogenes*.

## **2.8 El género *Listeria monocytogenes***

El género *Listeria* se encuentra altamente distribuido a nivel mundial, está representado por 7 especies (*Listeria innocua*, *Listeria weishimeri*, *Listeria seeligeri*,

*Listeria grayi*, *Listeria murrayi*, *Listeria monocytogenes* y *Listeria ivanovii*) sin embargo sólo dos son las que causan patologías en humanos y animales (*L. monocytogenes* y *L. ivanovii*). La especie más importante por la patología en humanos es *L. monocytogenes* (Torres et al, 2005).

*Listeria monocytogenes* tiene un cromosoma circular de 2,944,528 pares de bases con un contenido de Guanina:Citocina de 39%. Se ha visto que *Listeria spp.* presenta 331 genes los cuales codifican para diversas proteínas de transporte lo cual ayuda a este microorganismo a colonizar y crecer en gran diversidad de ecosistemas. Los componentes reguladores del genoma de *Listeria monocytogenes* son parecidos a otras bacterias como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Clostridium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.* y *Bronchothrix spp.* En estudios en ratón y en líneas celulares intestinales Caco-2 se ha observado que *Listeria monocytogenes* tiene gran heterogeneidad en la virulencia; pero cabe destacar que se han encontrado grandes diferencias entre virulencias de cepas de aislados clínicos y de alimentos; siendo las de origen clínico las que presentan dosis letales bajas. Basado en que *Listeria monocytogenes* presenta antígeno somático (O) y antígeno flagelar (H), se ha conocido la presencia de 13 serotipos de *Listeria monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7) pero destacando que el serotipo 4b causa más del 50% de los casos de listeriosis a nivel mundial y tres serotipos (1/2a, 1/2b y 4b) predominan en los alimentos (Torres et al, 2005).

Los genes responsables de la virulencia de *Listeria spp.* se encuentran organizados en islas de patogenicidad, éstas islas son obtenidas por la bacteria a través de mecanismos de transferencia de información genética horizontal. *Listeria*

*monocytogenes* posee mecanismos de virulencia los cuales los utiliza para invadir al huésped. Los mecanismos que destacan para el parasitismo intracelular son *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* y *plcB* y se encuentran organizados en una isla cromosomal de 9 kb a la cual se le denomina grupo de genes de virulencia PrfA dependiente (Vázquez-Boland, 2001).

*Listeria monocytogenes* se encuentra altamente difundida en el medio ambiente. Se ha encontrado en diversos sitios ambientales como pasto, arroyos, ríos, suelo, plantas, barro, heces humanas y animales, además en una gran variedad de alimentos. La dosis infectiva de *L. monocytogenes* en personas inmunocomprometidas es de  $10^2$  UFC viables y de  $10^4$  UFC viables en personas sanas (Alcayaga y Hott, 2008).

Se ha encontrado que los alimentos siempre se han visto implicados en casos de listeriosis y los alimentos que destacan son: quesos, leches, patés, salchichas, ensalada de col, pollo, sala, hortalizas, carne de pavo, cárnicos listos para el consumo, embutidos y lengua de cerdo; pero los alimentos que son considerados de alto riesgo para contraer listeriosis son los listos para el consumo, los cuales incluyen bebidas, ya que son alimentos que no van a ser cocidos antes del consumo (Muñoz, et al 2011).

*Listeria monocytogenes* es un bacilo Gram positivo que mide de 0.4 a 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 0.5 a 2  $\mu\text{m}$  de longitud. Su metabolismo es anaerobio facultativo, no produce esporas a temperaturas entre 20 a 25°C, muestra la característica de motilidad; tiene capacidad de formar una biopelícula. Puede crecer en un rango de pH entre 6 y 9; y en temperaturas que van desde 1 a 45°C, aunque su crecimiento óptimo es entre 30 a 37°C. Puede crecer a altas concentraciones de sal y tiene la



capacidad de adherirse a superficies que están en contacto con alimentos, formando biopelículas y de esa manera evita ser destruido por desinfectantes, lo cual lo convierte en un patógeno difícil de controlar en el ambiente de fábricas de producción de alimentos, lo que conlleva a que la contaminación pueda darse en cualquier etapa del proceso de producción y convirtiéndolo en un foco de infección para el ser humano. En cuanto a pruebas bioquímicas es catalasa positivo, oxidasa negativo, rojo de metilo positivo y para la prueba de Vogues-Praskauer positiva. En agar sangre se observa que es un microorganismo  $\beta$ -hemolítico formándose una zona estrecha de hemólisis alrededor de las colonias alimentaria (Schuchat et al., 1991, Muñoz, 2012)

Las cepas de *Listeria monocytogenes* se encuentran altamente difundidas en el medio ambiente. Se ha encontrado en diversos sitios ambientales como pasto, arroyos, ríos, suelo, plantas, barro, heces humanas y animales, además en una gran variedad de alimentos. También ha sido demostrada su capacidad de sobrevivir a condiciones adversas ya que se ha logrado aislar de aguas residuales, agua de río y de lodos de depuración alimentaria (Schuchat et al., 1991).

## **2.9 Epidemiología y manifestaciones de *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* es un patógeno que se ha visto implicado en enfermedades de animales y ha sido aislado de bovinos, porcinos, ovejas, pollos, patos y gran variedad de especies. La enfermedad por *L. monocytogenes* provoca muerte fetal intrauterina y meningoencefalitis alimentaria (Schuchat et al., 1991).

En humanos las enfermedades por *L. monocytogenes* se dan durante el embarazo, inmunosupresión o en personas de la tercera edad. En 1980 se dieron diversos brotes por este patógeno donde se demostró que la listeriosis es una epidemia que se transmite por la ingesta de alimentos contaminados, ocasionando un gran problema de salud público y de igual forma para la industria alimentaria. Murray y colaboradores sugirieron que la puerta de entrada es por medio del tracto gastrointestinal y la bacteria ha sido detectada en heces de individuos sanos, un hecho que sugiere que el tracto gastrointestinal es el reservorio en el humano (Schuchat et al., 1991).

*L. monocytogenes* es responsable de la listeriosis, una infección con una tasa de mortalidad entre 20-30% en grupos de riesgo (ancianos, inmunocomprometidos). Hay 2 tipos de listeriosis, la no invasiva que en individuos inmunocompetentes se desarrolla como un cuadro febril y gastroenteritis y la forma invasiva que se presenta en personas inmunocomprometidas que se manifiesta como meningoencefalitis o septicemia. Por otra parte se encuentra la infección fetal, la cual la madre se la pasa al hijo a través de la placenta, lo cual genera una alta probabilidad de aborto, muerte fetal o que nazca con septicemia o meningoencefalitis (Donagay, 2003).

Al ser una bacteria que causa cuadros clínicos graves y que implica un alto índice de mortalidad, la listeriosis es considerada enfermedad de alto impacto. En 2007 en Europa se reportaron 1558 casos de listeriosis con un índice de mortalidad general de 20% y en adultos mayores fue de 67%. En Estados Unidos en 2010 se reportaron 1662 casos, de los cuales 1520 necesitaron ser hospitalizados y 266 fueron decesos. Tanto Europa como Estados Unidos cuentan con organizaciones que vigilan la calidad microbiológica de los alimentos (Autoridad Europea de Seguridad

Alimentaria y Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, respectivamente). En México existe la Dirección General de Enfermedades, sin embargo esta organización no cuenta con información precisa sobre casos de listeriosis y por ende no se puede evaluar el impacto en la población. En 2009 hubo 120,806 reportes de abortos espontáneos; para el 2011 se reportaron 5, 283,896 casos de gastroenteritis, 44,467 casos de intoxicaciones a causa de alimentos contaminados y 957 casos de meningitis, sin embargo ninguno tiene un diagnóstico etiológico definido, cabiendo la posibilidad de que la mayoría de los casos pudiera estar implicada *Listeria monocytogenes* (Castañeda-Ruelas et al, 2014).

*L. monocytogenes* infecta de manera oral por medio de los alimentos contaminados y es capaz de atravesar 3 barreras fisiológicas (intestinal, hemato-encefálica y placentaria). Al cruzar la barrera intestinal la bacteria es absorbida en el lumen, atravesando la capa de células epiteliales, disuadiendo al sistema inmune y pudiendo llegar a la sangre y a los ganglios linfáticos, lugares que le permitirán alcanzar el hígado y bazo y es aquí donde la bacteria logra la replicación (Donagay, 2003).

## **2.10 Factores de patogenicidad de *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* es un patógeno intracelular facultativo, logra sobrevivir y multiplicarse dentro de células epiteliales, macrófagos y células dendríticas (estas últimas son líneas celulares de defensa) (Donagay, 2003).

Este microorganismo involucra diferentes factores de virulencia en las diferentes etapas de invasión, el primer paso de infección y el más importante es la adherencia

a las células ya que así comienza el ciclo de infección celular. Una proteína importante en este proceso es Lap (denominada proteína de superficie p104), la cual logra promover la adhesión bacteriana a las células intestinales. Estudios en cepas deficientes de la proteína Lap han demostrado que esta es una proteína fundamental de virulencia. La proteína FbpA se encuentra sobre la superficie de la bacteria y se une a la fibronectina del huésped, lo cual aumenta la adherencia de la bacteria; además esta proteína no solo sirve de adherencia sino también parece funcionar como proteína chaperona que asegura la producción de Listeriolisina O (LLO) e InIB. También está la proteína LapB, la expresión de esta proteína se encuentra regulada de manera positiva por PrfA. LapB también es necesaria para la adhesión y entrada en las células del huésped, la función de esta proteína se encuentra localizada en el dominio N-terminal, que se ha visto interacción con la célula huésped (Reis, 2010).

La entrada de *Listeria monocytogenes* a los macrófagos es inducida por la propia célula; sin embargo la entrada a otro tipo de células por fagocitosis es inducida por mecanismos de la bacteria; principalmente por la interacción de proteínas de superficie que son las Internalinas A (InIA) y B (InIB), que son los mediadores de entrada a las células no fagocíticas. Ambas proteínas pertenecen a la familia de las internalinas, contienen una señal de secuencia de péptido, seguido por la región rica en leucina que permite interacciones proteína-proteína, seguido por una secuencia conservada y diferentes motivos de C-terminales. InIA presenta un motivo LPXTG unida de manera covalente la proteína con la pared celular. El dominio C-terminal de InIB está dado por repeticiones de GW implicado en interacciones no covalentes con la pared celular (Camejo, 2011).

Para que la bacteria pueda internalizarse dentro de la célula del huésped requiere de un receptor específico, este receptor es la E-cadherina; es una glicoproteína transmembranal dependiente de calcio. Esta proteína interacciona directamente con InIA. E-cadherina se encuentra en la membrana basolateral de las células y es activada por la presencia de prolina en la posición 16 de la glicoproteína, es por ello que la entrada de *Listeria monocytogenes* ocurre en la parte basolateral de las células epiteliales. Estudios han mostrado que la adhesión a células epiteliales depende de las regiones ricas de leucina de la InIA, debido a que estas regiones interactúan directamente con el dominio extracelular de la E-cadherina; y aparte E-cadherina actúa con la actina del citoesqueleto provocando un reordenamiento. Esta interacción es crítica para la invasión a células epiteliales. (Pizarro-Cerdá, 2006).

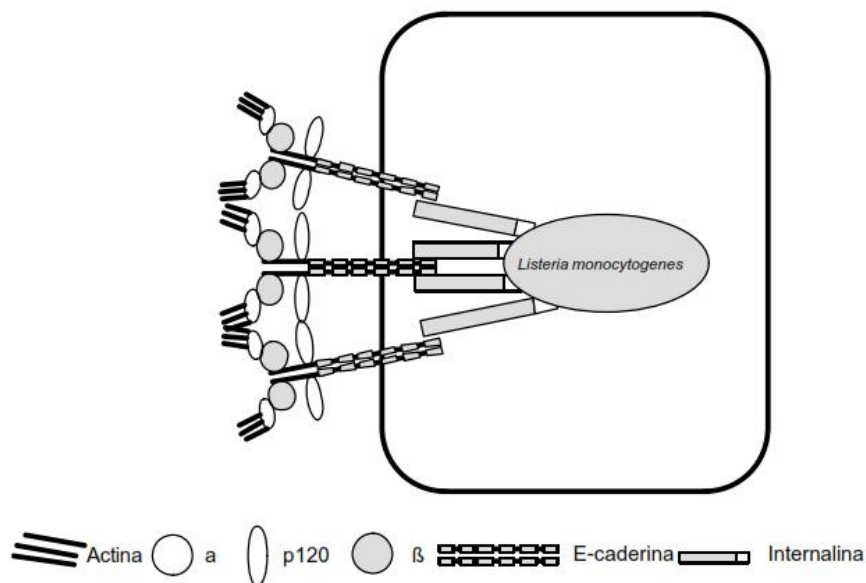


Figura 9. Interacción de InIA con E-cadherina. La región rica en leucina de InIA interacciona con la proteína E-cadherina, provocando un cambio en el complejo de unión de la E-cadherina tras la fosforilación de p120; desencadenando la captura de la bacteria por la célula hospedera (Torres et al., 2005)

La InIB contiene una secuencia péptido señal, una región rica en leucina conformada por una región cap N-terminal y una región tubular extensa constituida de motivos lamina  $\beta$  seguidos de hélices, una región inter repetitiva conservada (simulando una inmunoglobulina) y una región C-terminal conformada por 3 regiones conservadas de 80 aminoácidos, incluyendo un dipéptido inicial Gly-Trp (región GW). Esta región GW de la InIB da una interacción específica al receptor gC1qR (Parida et al, 1998).

La interacción internalina B con el receptor de las células de mamífero C-Met se da a través de una región rica en leucina. C-Met es un heterodímero compuesto por una sub unidad a y b; estas sub unidades comprenden el dominio extracelular. El sitio de autofosforilación específico para la funcionalidad del receptor es la sub unidad b, el cual presenta un dominio transmembranal y una cola citoplasmática con dominio rico en tirosina y actividad tirosinquinasa (Parida et al, 1998).

Otro tipo de ligando que ha sido encontrado para la InIB son los glicosaminoglicanos (GAGs), estos compuestos se encuentran en los proteoglicanos, los cuáles se encuentran sobre la superficie de células de mamíferos y permiten el ingreso de bacterias. Los glicosaminoglicanos dan lugar a la oligomerización y almacenamiento de factores celulares de crecimiento en la superficie celular. La InIB interacciona con los GAGs a través del dominio GW. La presencia de los GAGs proporciona incremento de la activación del receptor C-Met dependiente de InIB (Parida et al, 1998).

La región rica en leucina de la InIB interacciona con el dominio extracelular C-Met y la región GW interactúa con el receptor gC1qR; esta interacción (InIB-gC1qR) es dada por presencia de cationes divalentes y además la región N-terminal posee el sitio blanco, lo cual induce una fosforilación de tirosinas de las proteínas Gab1, Cbl y

Shc, activando a su vez a la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) promoviendo la señalización. Posterior, la proteína p85 interactúa con proteínas tirosín-fosforiladas activando p85-p110, provocando un incremento en los niveles de fosfatidilinositol-3,4-difosfato y de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato. Estas fosfoinositidinas realizan acción como de segundos mensajeros y su elevada concentración afecta la curvatura de la bicapa lipídica de la membrana, ocasionando que el microorganismo se internalice. Estudios anteriores han demostrado que PI3K p85/p110 es indispensable para la fagocitosis mediada por InIB (Parida et al, 1998).

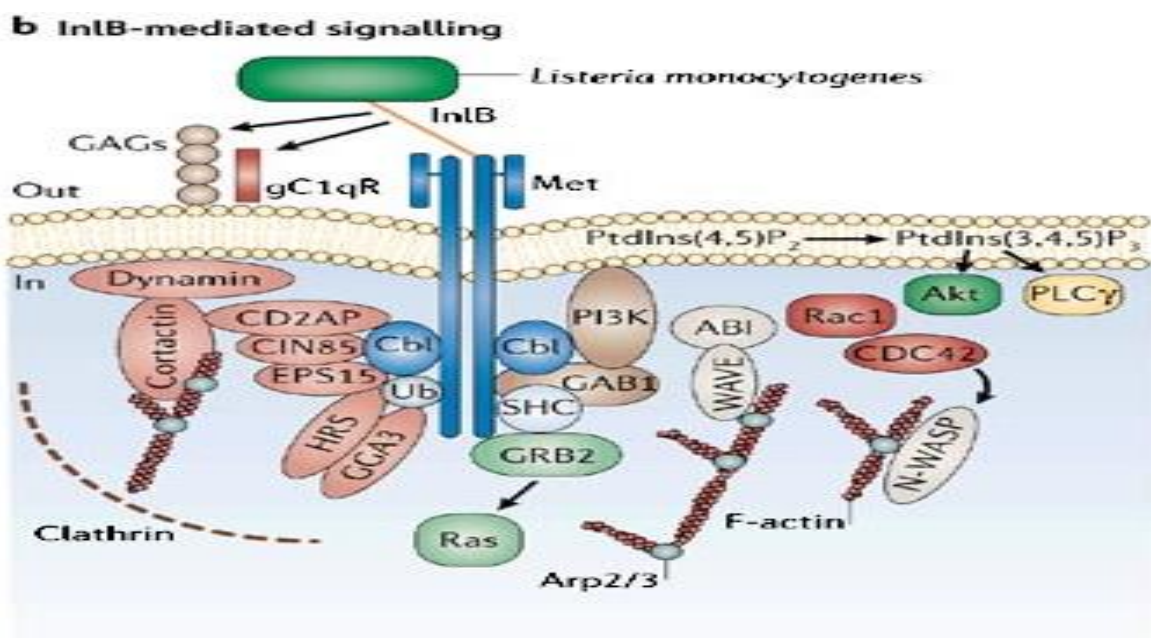


Figura 10. Interacción InIB-célula del huésped. InIB se asocia a la superficie bacteriana mediada por interacción con los GAGs. El dominio rico en leucina de InIB interactúa con el dominio extracelular del receptor C-Met y el sitio GW interactúa con el receptor gC1qR promoviendo fosforilación de tirosinas de las proteínas Gab1, Cbl y Shc, la formación de complejos con estas proteínas fosforiladas y la subunidad p85 de PI3K dan lugar al reacomodo del citoesqueleto para que se dé la invasión (Hamon et al, 2006).

La InIC al igual que la InIA tiene péptido señal y dominios ricos en leucina con varias repeticiones en la parte N-terminal y un motivo LPXTG en su sitio C-terminal. InIC se expresa en el citoplasma, específicamente cuando la diseminación intercelular de la bacteria está activa por lo cual se sugiere que esta internalina se encuentra implicada en la diseminación de la infección célula-célula; sin embargo no se ha identificado ningún objetivo intracelular para esta internalina (Hamon et al, 2006).

Después de la adherencia y antes de entrar al citoplasma celular la bacteria es atrapada en una vacuola fagocítica y LLO juega un papel muy importante ya que es el responsable de que *Listeria monocytogenes* escape de la vacuola y por lo tanto se convierte en un principal factor de virulencia. El gen que codifica a LLO fue el primer gen de virulencia identificado; es una toxina secretada que pertenece a la familia de la citolisina dependiente del colesterol. La actividad de LLO es óptima al pH de la vacuola fagocítica y disminuye al pH neutro del citoplasma, causa lisis de las vacuolas fagocíticas por medio de formación de poros y por ende LLO suprime la respuesta inmune del huésped. También la disrupción de la membrana fagosomal está dada por una amplia variedad de fosfolipasas y fosfatidilinositol (plcA y plcB). Estas enzimas actúan junto con LLO para causar la lisis de las vacuolas. Las fosfolipasas están expresadas como proenzimas y se activan mediante el pH ácido de la vacuola y es mediada por una metaloproteasa dependiente de zinc (Mpl) (Gedde, 2000).

Ya evadido el sistema de defensa celular y que *Listeria monocytogenes* se encuentra en el citosol inicia su replicación, para ello utiliza glucosa-1-fosfato presente en el citoplasma para llevar a cabo sus procesos energéticos (Camejo, 2011).



Uno de los principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* en el citosol es la proteína ActA, la cual es responsable de la polimerización de filamentos de actina en el polo de las bacterias, dando lugar a una estructura parecida a una cola de cometa lo que le permite el movimiento en el citosol de la célula huésped, permitiendo la invasión a células vecinas (Camejo, 2011)

ActA es una proteína superficial de *Listeria monocytogenes* codificada por el gen actA, consta de 3 dominios y de 610 aminoácidos. Dentro de los 3 dominios está el N-terminal que va del aminoácido 1 al 234 y es fundamental para llevar a cabo la polimerización de la actina en el citosol de la célula del huésped. Un segundo dominio es el central, el cual va del aminoácido 235 a 395 y actúa estimulando la motilidad debido a las 4 regiones pequeñas repetidas ricas en prolina, las cuales actúan como sitios de interacción con las proteínas VASP. Por último el dominio C-terminal hidrofóbico que va del aminoácido 396 al 610, con el cual la actina tiene una interacción y se fija a la superficie bacteriana (Vázquez-Boland 2001).

ActA comparte similitudes con proteínas de células eucariotas relacionadas con la actina del citoesqueleto; por ejemplo, su dominio N-terminal presenta secuencias homólogas a la región C-terminal de la vinculina (proteína asociada a fibras de tensión y adherencia focal). El dominio N-terminal de ActA forma homodímeros y cada dímero se une a otro de actina dando lugar a la polimerización (Vázquez-Boland 2001).

ActA predomina en un polo de la bacteria y determina la dirección del movimiento, pero para dar lugar al movimiento tiene que interactuar con otras proteínas del citoesqueleto del huésped, como lo son VASP, profilina y Arp2/3 ya que han sido

detectadas formando parte de la cola de actina del microorganismo (Vázquez-Boland 2001).

VASP interacciona con la región central de ActA, al mismo tiempo que la profilina ocasionando la polimerización de actina; en cambio, la profilina interacciona con los monómeros de actina y regula su ensamble. El complejo Arp2/3 se localiza en la superficie de la bacteria y a lo largo de la cola de actina y lleva a cabo la interconexión de los filamentos de actina (Vázquez-Boland 2001).

El gen *actA* secreta una proteína denominada ActA que consta de 639 aminoácidos que se encuentra unida a la bacteria en la pared celular por medio de su región C-terminal. Estudios han mostrado que esta proteína confiere a *Listeria monocytogenes* virulencia y motilidad intracelular basada en la actina. La región N-terminal de ActA tiene un rol específico ya que contiene la información específica para iniciar el ensamblaje de F-actina y el movimiento bacteriano. Se identificó en ActA un dominio rico en aminoácidos cargados positivamente los cuales son necesarios para el ensamble de actina. También está demostrado que los aminoácidos 117 a 121 son críticos para la elongación del filamento de actina y se ha visto que una delección en aminoácidos 21 a 97 provocan una formación discontinua de la cola de actina. Para que ActA induzca polimerización de actina debe interactuar con un complejo denominado Arp2/3, lo cual provoca aumento en la producción de actina. El complejo Arp2/3 incluye 2 proteínas relacionadas con la actina Arp 2 y Arp3. Este complejo inicia el ensamblaje de actina en la superficie celular de *Listeria*. El complejo Arp2/3 es activado por las proteínas denominadas Wiscott-Aldrich que conectan el citoesqueleto con las vías de señalización implicadas en la remodelación dinámica de la estructura de actina. Por lo tanto

Arp2/3 es un factor esencial en la célula del huésped para la estimulación del filamento de actina y la motilidad. Además altos niveles de ATP-G-actina y prolinina-actina son esenciales para elongación de la cola de actina y motilidad (Vázquez-Boland 2001).

### **2.11 Resistencia antimicrobiana de *Listeria monocytogenes***

Varios estudios han revelado la resistencia a agentes antimicrobianos de *Listeria monocytogenes*, debido a que varias cepas han sido aisladas de casos clínicos en humanos, alimentos o inclusive del medio ambiente y han resultado ser resistentes a uno o varios fármacos. La resistencia de listeria a los agentes antimicrobianos es debido a que el material genético que participa en la evolución adaptativa a corto plazo puede ser transferido exitosamente a *Listeria*, además presenta gran heterogeneidad genética, indicando que la transferencia horizontal de genes es sumamente común en esta bacteria y que además los bacteriófagos tienen un rol importante en la plasticidad de este microorganismo. La conjugación de plásmidos, transposones y genes que por conjugación pueden ser transmitidos a *Listeria* han provocado las resistencias antimicrobianas (Bolívar et al, 2008).

En 1988 se reportó la primer cepa de *Listeria monocytogenes* resistente a tetraciclina y esta resistencia ha sido frecuente en aislados de animales y humanos y es codificada en plásmidos auto transmisibles; además los fármacos de elección para la listeriosis es ampicilina y penicilina, sin embargo la bacteria ha mostrado resistencia contra estos fármacos y un factor de importancia es la habilidad que tiene este patógeno de adaptarse a condiciones adversas, de manera que la exposición a

concentraciones subletales de agentes antimicrobianos, provee la adaptación y adquisición de resistencia al antibiótico (Bolívar et al, 2008).

Debido al uso inadecuado de antibióticos que ha conferido a los microorganismos a generar capacidades de multirresistencia, lo cual ha hecho que día con día las infecciones bacterianas sean más difíciles de erradicar y estos microorganismos puedan generar mayor número de decesos. Recientemente, han surgido alternativas de fuentes naturales como es el uso de miel, obtención de péptidos antimicrobianos o metabolitos secundarios como es el caso de flavonoides; un estudio de Zamora (2013), donde evaluó la actividad antimicrobiana de miel de *Apis mellífera*, *T. angustula* y *M. beecheii* contra diversos microorganismos patógenos como *L. monocytogenes*, en los que determinó que logran inhibir a este patógeno en la concentración de 50% (v/v).

En este trabajo se determinó la actividad antimicrobiana de difusión en disco y concentración mínima inhibitoria de la miel de *Melipona beecheii*, su extracto fenólico y proteico contra *Listeria monocytogenes*; para determinar la capacidad de la miel y sus componentes proteicos y fenólicos como agentes antimicrobianos y en un futuro ser una alternativa natural contra cepas multirresistentes.

### 3 JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades por transmisión alimentaria (ETA) son un problema de salud pública mundial que no se han podido erradicar y generan aproximadamente mil setecientos millones de casos de enfermedades diarreicas, afectando principalmente a niños menores de 5 años en los cuales hay decesos de setecientos mil niños al año. Entre los principales patógenos relacionados con ETA se encuentra *Listeria monocytogenes*, este microorganismo es bastante agresivo en el ser humano pudiendo ocasionar además de las infecciones gastrointestinales, problemas neurológicos e inmunológicos. Los fármacos utilizados comúnmente contra este patógeno son penicilina y ampicilina para *L. monocytogenes* los cuales han demostrado ser poco efectivos ya que las bacterias han mostrado resistencia contra los antibióticos; además al ser antibióticos de amplio espectro dañan la microbiota del ser humano. Una alternativa viable para combatir infecciones por estos patógenos podría ser la miel de *Melipona beecheii* porque se le han atribuido múltiples propiedades farmacológicas; por lo cual el presente trabajo pretende determinar la actividad antimicrobiana de la miel así como de los extractos fenólicos y proteicos presentes en la misma contra *L. monocytogenes* ATCC 15313, además de conocer su efecto en la expresión genética de algunos factores de virulencia de dicha cepa.

## **4 HIPÓTESIS**

Los extractos proteicos y fenólicos de la miel de *M. beecheii* podrán presentar actividad antimicrobiana y de igual manera afectar la expresión de los genes de patogenicidad de *L. monocytogenes* ATCC 15313

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de la miel de *Melipona beecheii*, su extracto fenólico y proteico en el crecimiento de *L. monocytogenes* ATCC 15313 para determinar su actividad antimicrobiana y su efecto en la expresión de los genes de patogenicidad.

## 5.2 Objetivos específicos

- Determinar la actividad antimicrobiana de la miel y el extracto fenólico y proteico contra *L. monocytogenes* mediante ensayo de difusión en disco y Concentración Mínima Inhibitoria.
- Determinar la cinética de muerte de *L. monocytogenes* con la miel de *Melipona beecheii*.
- Determinar el porcentaje de muerte de *L. monocytogenes* con el extracto fenólico de la miel de *Melipona beecheii*
- Evaluar la expresión de los genes de patogenicidad de *L. monocytogenes* utilizando la miel y el extracto fenólico en condiciones subletales.

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Materia prima y microorganismos empleados

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

La cepa bacteriana que se utilizó en el presente trabajo es una cepa de colección de *L. monocytogenes* ATCC 15313

### 6.2 Extracción de los compuestos fenólicos de la miel de *Melipona beecheii*.

Para obtener los compuestos fenólicos presentes en la miel de melipona se empleó el método propuesto por Ferreres *et al*, 1994 donde se utilizaron 200 g de miel con 5 partes de agua ácida (pH 2 con HCl), la mezcla fue filtrada a través de algodón previamente tratado con acetona para eliminar las partículas sólidas contenidas en la miel. Posteriormente la mezcla se pasó por una columna con 200 g de Amberlita XAD-2, después la columna se lavó con 100 mL de agua ácida (pH 2) y posteriormente otro lavado con 300 mL de agua destilada. Los compuestos fenólicos fueron retenidos en la columna y se recuperaron con 300 mL de metanol hasta que el disolvente no presentó algún color.



Los extractos metanólicos obtenidos de la columna, se concentraron a presión reducida en un rotavapor a 40 °C hasta evaporar completamente el metanol. Los compuestos fenólicos se resuspendieron en 15 mL de agua destilada. La muestra fue particionada en 3 ocasiones mediante una extracción líquido-líquido con 15 mL de acetato de etilo; se recuperó la fase acuosa en cada ocasión. Después la fase acuosa recuperada se le agregó Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro en suficiente cantidad para eliminar el agua restante de las muestras. Por último se dejó evaporar el acetato de etilo y se recuperó el extracto fenólico en 1 mL de metanol grado puro y se almacenó a -20°C para su posterior uso.

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

Para determinar el contenido fenólico de la miel, se utilizó el método descrito por Saravana y Mandal, 2009, con el reactivo de Folin-Ciocalteu; el extracto fenólico obtenido se diluyó 10:1000 (10 µL de extracto con 990 µL agua destilada). Para reportar dicho contenido se realizó una curva estándar de ácido gálico con concentraciones de 0, 20, 40, 80, 160 y 320 mg/mL.

Al extracto fenólico (o estándar de la curva) se le agregaron 1250 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 1:10 en agua destilada), se agitó por 30 segundos con Vortex y se dejó reposar por 2 minutos a temperatura ambiente. A continuación se agregó 400 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (75g/L), se incubó durante 15 min a 50°C y finalmente se enfrió a temperatura ambiente. La absorbancia de la muestra y estándares se determinó a 760 nm utilizando un espectrofotómetro UV/VIS Perkin-Elmer Lambda XLS.

#### **6.4 Extracción de los compuestos proteicos de la miel de *Melipona beecheii*.**

Para la extracción de las proteínas presentes en la miel se empleó el método descrito por Schmitzova' *et al.*, 1998. El cual consiste en diluir 4 g de la miel de melipona en 40 mL de buffer de fosfatos (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM NaCl, pH 7.0). La mezcla se incubó en hielo por 30 minutos, con intervalos de agitación de 5 minutos. Posterior a la agitación la mezcla fue centrifugada a 5000xg por 30 min para eliminar polen y diversas partículas presentes en la miel.

El sobrenadante se concentró mediante ultrafiltración, utilizando filtros Amicon de 3 kDa y las muestras se centrifugaron a 5000 g por 40 min. Una vez centrifugada las muestra el concentrado se traspasó a tubos de 1.5 mL y se almacenaron a 4°C hasta su posterior análisis.

#### **6.5 Determinación de la concentración en el extracto proteico de la miel de *Melipona beecheii***

El contenido proteico se determinó por medio del método de Bradford, 1976, para reportar dicho contenido se realizó una curva estándar de BSA (Albumina sérica Bovina) de la marca sigma con concentraciones de 1, 2.5, 5, 10, 15, 20 µg/µl.

Se tomaron 10 µl del extracto y fue diluido en 90 µl de H<sub>2</sub>O destilada, a los cuales se les adicionó 1mL de la solución de Bradford. Las muestras se incubaron por 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad y al finalizar el tiempo, se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm, usando como blanco el buffer de fosfatos. La cuantificación se realizó por triplicado.

Se realizó un gel en electroforesis de poliacrilamida SDS-PAGE para determinar el perfil electroforético del extracto proteico de la miel de *Melipona beecheii*, el gel de apilamiento se realizó en una concentración de 4% y el gel de separación en concentración de 12% y se corrió durante 2 horas a 80 volts. Posteriormente se realizó una tinción con plata para visualizar las bandas presentes en el extracto.

#### **6.6 Determinación de la actividad antimicrobiana de la miel, el extracto fenólico y proteico de la miel de *Melipona beecheii* mediante difusión en disco**

En la determinación de la actividad antibacteriana de miel de melipona, su extracto fenólico y proteico se realizó por el método de difusión en disco descrito por Schwalbe et al., 2007, utilizando la cepa *L. monocytogenes* ATCC 15313. Esta cepa previamente fue sembrada en medio sólido Luria Broth (LB) por estría cruzada y se dejó incubar por 10 horas a 37°C.

Transcurrido el tiempo se tomó una asada de las colonias y se diluyeron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL con solución salina, hasta ajustar el inóculo a una concentración de 0.5 en la escala McFarland ( $1 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) para su empleo.

Se utilizaron medios sólidos de Mueller Hinton; estos medios fueron inoculados en siembra masiva con las bacterias utilizando un hisopo estéril. Posteriormente se colocaron discos de papel filtro estériles de la marca Millipore, en donde se les adicionó diferentes concentraciones de miel y extractos a evaluar. Para el caso de la miel se evaluaron concentraciones de 10, 20, 40 y 80% v/v, utilizando como

control negativo agua estéril; para el extracto fenólico se evaluaron concentraciones de 591 y 620 µg EAG/mL, utilizando como control negativo 10 µL metanol. Para el caso del extracto proteico se evaluaron de la misma forma 80, 100 y 120 µg/mL, utilizando como control negativo 120 µL buffer de fosfatos. En todos los medios se utilizó Ampicilina como control positivo a una concentración de 30 µg. Todas las placas se incubaron a 37°C por 24 horas.

### **6.7 Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria de la miel de *Melipona beecheii*, su extracto fenólico y proteico.**

Se evaluaron concentraciones de miel en porcentaje v/v desde 10% hasta 30%; del extracto proteico de 70 a 90 µg/mL y del extracto fenólico de 300 a 700 µg EAG /mL; se utilizaron tubos Eppendorf de 1.5 mL, con 250 µl de medio líquido Mueller Hinton a doble de concentración (2X). Posteriormente, a cada tubo con medio Mueller Hinton 2X se le agregó el extracto a evaluar cuya cantidad adicionada dependió de la concentración final deseada teniendo en cuenta que el volumen final en cada tubo fue de 500 µl.

Como controles negativos se utilizaron 50 µL de agua destilada estéril; 10 µL de metanol y 75 µL de buffer de fosfatos y como control positivo Ampicilina en concentración de 50 µg.

Las muestras de las microdiluciones se incubaron a 37° C durante 24 horas, después se leyó su absorbancia a 600 nm en un biofotómetro Eppendorf 6131 (Schwalbe *et al.*, 2007).

### **6.8 Determinación de cinética de muerte de *L. monocytogenes* con miel de *Melipona beecheii*.**

Se evaluaron concentraciones de miel de *Melipona beecheii* 0.5x (8.5% v/v) y 1x (17% v/v) con respecto a la CMI; se utilizaron tubos Eppendorf de 1.5 mL, con 250 µl de medio líquido Mueller Hinton a doble de concentración (2X). Posteriormente, a cada tubo con medio Mueller Hinton 2X se le agregó la concentración de miel a evaluar cuya cantidad adicionada dependió de la concentración final deseada teniendo en cuenta que el volumen final en cada tubo fue de 500 µl. Se añadieron 50 µl de solución bacteriana de *L. monocytogenes* con concentración 0.5 con respecto a la escala McFarland.

Los tubos se incubaron en agitación a 150 rpm a 37°C y se hicieron lecturas a diferentes horas (0, 0.5, 1, 3, 5, 7 y 24) en un biofotómetro Eppendorf 6131 y se realizaron diluciones seriadas, se inocularon 100 µl por triplicado en placas de agar LB y se homogenizaron con ayuda de una varilla estéril. Las placas de agar LB se incubaron a 37°C y a las 24 horas se realizó un conteo de unidades formadoras de colonias.

### **6.9 Determinación del porcentaje de inhibición de *Listeria monocytogenes* con extracto fenólico de miel de *Melipona beecheii*.**

Se evaluaron concentraciones de extracto fenólico de miel de *Melipona beecheii* 0.5x, 1x y 2x con respecto a la CMI; se utilizaron tubos Eppendorf de 1.5 mL, con 250 µl de medio líquido Mueller Hinton a doble de concentración (2X). Posteriormente, a cada tubo con medio Mueller Hinton 2X se le agregó la

concentración de extracto fenólico, el volumen final en cada tubo fue de 500 µL. Se añadieron 50 µL de solución bacteriana de *L. monocytogenes* con concentración 0.5 con respecto a la escala McFarland.

Los tubos se incubaron en agitación a 150 rpm a 37°C y se realizaron las lecturas a las 24 horas en un biofotómetro Eppendorf 6131 y se realizaron diluciones seriadas, se inocularon 100 µl por triplicado en placas de agar LB y se homogenizaron con ayuda de una varilla estéril. Las placas de agar LB se incubaron a 37°C y a las 24 horas se realizó un conteo de unidades formadoras de colonias.

#### **6.10 Extracción de ADN genómico total de *Listeria monocytogenes***

En la extracción de ADN se utilizó el método descrito por Velázquez et al, (2014), se tomaron las colonias de un cultivo de bacterias en medio líquido infusión cerebro corazón; para esto las muestras se centrifugaron a 10 mil g por 10 minutos a 4°C; se deshecho el sobrenadante y el pellet formado se suspendió en 500 µL de buffer TE (10 mM Tris-HCl y 1mM EDTA).

Después se añadieron 30 µL de SDS al 10% y 3 µL de Proteinasa K (20 mg/mL), se incubó por 60 minutos a 37°C. Después de la incubación se agregaron 100 µL de NaCl 5 M y 80 µL CTAB/NaCl (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 10% y NaCl 5 M en proporción 1:1), incubándose a 65°C por 10 minutos.

Posteriormente se añadió un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (Phe:Cl:I) (25:24:1) y se mezcló por inversión para después centrifugarse a 12000 g por 10 minutos. Al término de la centrifugación se recuperó la fase acuosa en un

tubo nuevo y se volvió a lavar la muestra agregando la misma mezcla Phe:Cl:I bajo las mismas condiciones.

Posteriormente se recuperó el sobrenadante al cual se le realizó un lavado de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 12 000 g por 10 minutos; después se transfirió la fase superior a un nuevo tubo.

El material genético se dejó precipitar toda la noche a -20°C con un volumen de 1 mL de etanol absoluto; después se centrifugó la muestra a 12000 g por 10 minutos; se decantó el sobrenadante y el pellet formado se dejó secar por completo y posterior se re suspendió en 20 µL de agua destilada estéril.

Las muestras obtenidas se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

Para visualizar la integridad del ADN genómico se preparó un gel de agarosa con buffer TAE 1x (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM; pH 8.3) en concentración del 0.8%. A la mezcla de agarosa con TAE se le añadieron 2 µL de bromuro de etidio como agente intercalante.

Las muestras se prepararon con 4 µL del ADN genómico y se añadió 2 µL de buffer de carga (azul de bromofenol); se mezcló homogéneamente y se colocaron las muestras en los pocillos del gel y se corrió la muestra a 80 V por 45 minutos. Transcurrido el tiempo el gel se colocó sobre un transluminador y se encendió la lámpara de luz ultravioleta para visualizar el material genético.

Con el ADN genómico de *Listeria monocytogenes* se realizaron reacciones de PCR para verificar si los genes a evaluar estaban presentes en la bacteria; en la tabla 1 se muestran los genes a evaluar y el tamaño de bases esperado.

Tabla 1. Oligos diseñados para reacciones de ADN de los genes housekeeping y de virulencia de *Listeria monocytogenes*.

Nombre del oligo	Secuencia 5´-3´	Longitud (pb)	Tamaño esperado (pb)
LmHlyForw	ACCTATCCAGGTGCTCTCGT	20	690
LmHlyRev	ATCTTTTGCGGAACCTCCGT	20	690
LmPrfaForw	GCTATGTGCGATGCCACTTG	20	545
LmPrfaRev	ACGCTCAAGCAGAAGAATTCAA	23	545
LmInIAForw	ACATCAGTCCCCTAGCAGGT	20	550
LmInIARev	TGCGTCACGGTTCCACTAA	20	550
LmActAForw	AAAGATGCGGGGAAATGGGT	20	713
LmActARev	CTTAACGAAGGAACCGGGCT	20	713
LmPlcAForw	CCGAAGTGCATGCCGAATTT	20	505
LmPlcARev	CCGCTCTACCTGACACAACA	20	505
LmInICForw	CCCACAGGACACAACCATCT	20	634
LmInICRev	GGCCTAGCGAATGCAGTGA	19	634
LmGapForw	GCTTTAGCAGCACCAGTTGT	20	501



LmGapRev	AACTCAAGGCCGTTTTGACG	20	501
LmGapForwRT	AGCAGCTCCGTCTAATTTACCTTT	24	100
LmGapRevRT	ACGTGCTGCTGCCGAAAATA	20	100
LmRplDForw	GCCTTGTAAGTTGCGTGCAG	20	407
LmRplDRev	TTTTGAGCCAACGTGCATCC	20	407
LmRplDForwRT	ACCTGTACCTTTTTGACGCCAT	22	100
LmRplDRevRT	GAGCCAACGTGCATCCCTA	19	100
LmRpoBForw	TGTCCGATTGAAACGCCAGA	20	963
LmRpoBRev	TTCCGCACCAACACGGATAA	20	963
LmRpoBForwRT	AGCGAACATGCAACGTCAAG	20	100
LmRpoBRevRT	AGCAGCACCAGAGTCTTTTCG	20	100
LmSigBForw	AGTAGAGTCCATCGCCCGAA	20	444
LmSigBRev	CCATCATCCGTACCACCAACA	21	444
LmPrsForw	CGCTTCCGCAGCAACAATTA	20	532
LmPrsRev	AGCCGGACCTGAAAGAACTG	20	532
LmRecAForw	AGTACAAGCACAAGGCGGAA	20	576
LmRecARev	AGCTCACCTTCACGCGAAAT	20	576

### **6.11 Extracción de ARN de *Listeria monocytogenes* ATCC 15313**

Para la extracción de ARN se empleó el método propuesto por Chomczynski et al., (1987), para lo cual se tomó 1000 µL de un cultivo de bacterias con 24 horas de incubación y se colocaron en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL y se centrifugó a 12000xg durante 10 min, posteriormente se decantó el sobrenadante y se agregaron microperlas de cristal estériles, también se añadieron 400 µL de una solución de lisis (Acetato de sodio 320 mM a pH 4.6, SDS al 8% y EDTA a 16 mM). Se agitó con un vortex durante 2 minutos para lisar las células. Después se centrifugó a 12000 g durante 5 minutos.

El sobrenadante se colocó en un tubo estéril y se añadieron 400 µL del reactivo de Trizol, se agitó con Vortex durante un minuto y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos, y se transfirió el sobrenadante a un tubo estéril y se añadieron 200 µL de cloroformo, homogenizando la mezcla e incubando a temperatura ambiente por 10 minutos.

Se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante de la fase acuosa y se mezcló con 200 µL de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) en un tubo estéril. Se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos, se tomó el sobrenadante de la fase acuosa y se colocó en un tubo estéril, al cual se le añadieron 800 µL de etanol absoluto y se incubó a -20°C por 12 horas

Transcurridas las 12 horas se centrifugó a 12000 g por 30 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se añadieron 500 µL de etanol absoluto, de nuevo se centrifugó a 12000 g por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó secar el pellet para posteriormente resuspenderlo en 20 µl de agua milli Q estéril.

Para visualizar la integridad del ARN se preparó un gel de agarosa con buffer TAE 1x (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM; pH 8.3) en concentración del 0.8%. A la mezcla de agarosa con TAE se le añadieron 2  $\mu$ L de bromuro de etidio como agente intercalante.

Las muestras se prepararon con 4  $\mu$ L del ARN y se añadieron 2  $\mu$ L de buffer de carga (azul de bromofenol); se mezcló homogéneamente y se colocaron las muestras en los pocillos del gel y se corrió la muestra a 80 V por 45 minutos. Transcurrido el tiempo el gel se colocó sobre un transluminador y se encendió la lámpara de luz ultravioleta para visualizar el material genético.

Una vez visualizadas las bandas características del ARN se utilizó un kit de la marca de Thermo Scientific para realizar la síntesis de la primera cadena de ADN (ADNc).

En un tubo Eppendorf de 1.5 mL libre de ARNasa al cual se añadieron 2  $\mu$ L de ARN, posterior 1  $\mu$ L del primer Forward del gen de interés y 1  $\mu$ L del primer Reverse del gen de interés, seguido por 8  $\mu$ L de agua libre de ARNasa; posteriormente se añadieron 4  $\mu$ L de buffer de reacción, seguido por 1  $\mu$ L de la enzima RiboLock, 2  $\mu$ L de Dntp's y 1  $\mu$ L de la enzima Revert Aid RT, se incubó en baño maría a 42°C durante 1 hora; posteriormente para desactivar la enzima se incubó en un termoblock a 70°C durante 5 minutos, posterior se dejó enfriar en hielo.

Las muestras se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

## **6.12 Análisis de la expresión de los genes de virulencia de *Listeria monocytogenes* por PCR en tiempo real (qRT-PCR).**

El ADNc empleado para los ensayos de qRT-PCR fue preparado tomando una muestra del ARN total. Se realizó una dilución 1:125 en agua desionizada-destilada estéril.

Las reacciones fueron preparadas en un volumen conocido conformado por ADNc, oligonucleótidos (2  $\mu$ M), IQ SYBR Green Super Mix (Biorad, Hercules, CA, USA) y agua desionizada-destilada estéril. Las amplificaciones fueron realizadas por cuadruplicado en placas de reacción de 48 pozos, empleando el equipo StepOne Real Time-PCR (Applied Biosystem, Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA), a una temperatura de alineamiento de 61°C. Se utilizó el fluoróforo SYBR Green para detectar las amplificaciones.

También se realizó una curva de temperatura de fusión (Melt curve), y las reacciones de igual manera fueron preparadas por ADNc, oligonucleótidos (2  $\mu$ M), IQ SYBR Green Super Mix (Biorad, Hercules, CA, USA) y agua desionizada-destilada estéril.

Previo al análisis de qRT-PCR se verificaron con oligos específicos si en el ADNc obtenido se estaban expresando los genes mediante reacciones de PCR en un gradiente de temperatura de 58, 60 y 62 °C. A continuación en la tabla 2 se muestra el diseño de los oligos:

Tabla 2. Oligos diseñados para reacciones de ADNc de los genes housekeeping y de virulencia de *Listeria monocytogenes*.

Nombre del oligo	Secuencia 5'-3'	Longitud (pb)	Tamaño esperado
LmHlyForwRT	TGCATATATCTCAAGTGTGGCGT	23	100
LmHlyRevRT	TACGGCAGCATCAAAAGCAG	20	100
LmPrfaForwRT	TTGATAACGTATGCGGTAGCCT	22	100
LmPrfaRevRT	GGGCTTTCGTTATAATGTCTGGC	23	100
LmInIAForwRT	CATTTAGTGGAACCGTGACGC	21	100
LmInIARevRT	AAATTCCCAGCTTCCACTTCTTTG	24	100
LmActAForwRT	AAGAGTTGAACGGGAGAGGC	20	100
LmActARevRT	TCTTCTGTTGTCTCGCTGTTTTTC	23	100
LmPlcAForwRT	TTGCTCGTGTGTCAGTTCTGGG	20	100
LmPlcARevRT	ACGAGCAAAACAGCAACGATAG	22	100
LmInICForwRT	GGTCTGTAACACTTTGCTTCCC	22	100
LmInICRevRT	GAGAGTATTCAACGACCAACGC	22	100
LmGapForwRT	AGCAGCTCCGTCTAATTTACCTTT	24	100
LmGapRevRT	ACGTGCTGCTGCCGAAAATA	20	100
LmRplDForwRT	ACCTGTACCTTTTTGACGCCAT	22	100

LmRplDRevRT	GAGCCAACGTGCATCCCTA	19	100
LmRpoBForwRT	AGCGAACATGCAACGTCAAG	20	100
LmRpoBRevRT	AGCAGCACCCAGAGTCTTTCCG	20	100
LmSigBForwRT	AGAAACGGGTGAACTACTCGAT	22	100
LmSigBRevRT	CACTTCCTCATTCTGCAACGC	21	100
LmPrsForwRT	ACAGCTGGAACAATCACACTTG	22	100
LmPrsRevRT	TAGCCGGACCTGAAAGAACTG	21	100
LmRecAForwRT	GACGTGCGGAACAACCTGAAG	20	100
LmRecARevRT	TCGGCAATACGGAATGGTGG	20	100

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Curva de crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

Se realizó la curva de crecimiento de la cepa *L. monocytogenes* ATCC 15313 en medio LB como se puede observar en la figura 11, esto con el fin de conocer el comportamiento que presenta este microorganismo con base al tiempo de incubación, como se puede observar la fase exponencial del microorganismo se encuentra en el intervalo de 7 a 11 horas, ya que indica que el microorganismo se encuentra en una fase en la cual crece exponencialmente, donde la tasa de crecimiento bacteriana es máxima por lo tanto esta fase es la indicada para poder trabajar con el microorganismo en actividades antimicrobianas.

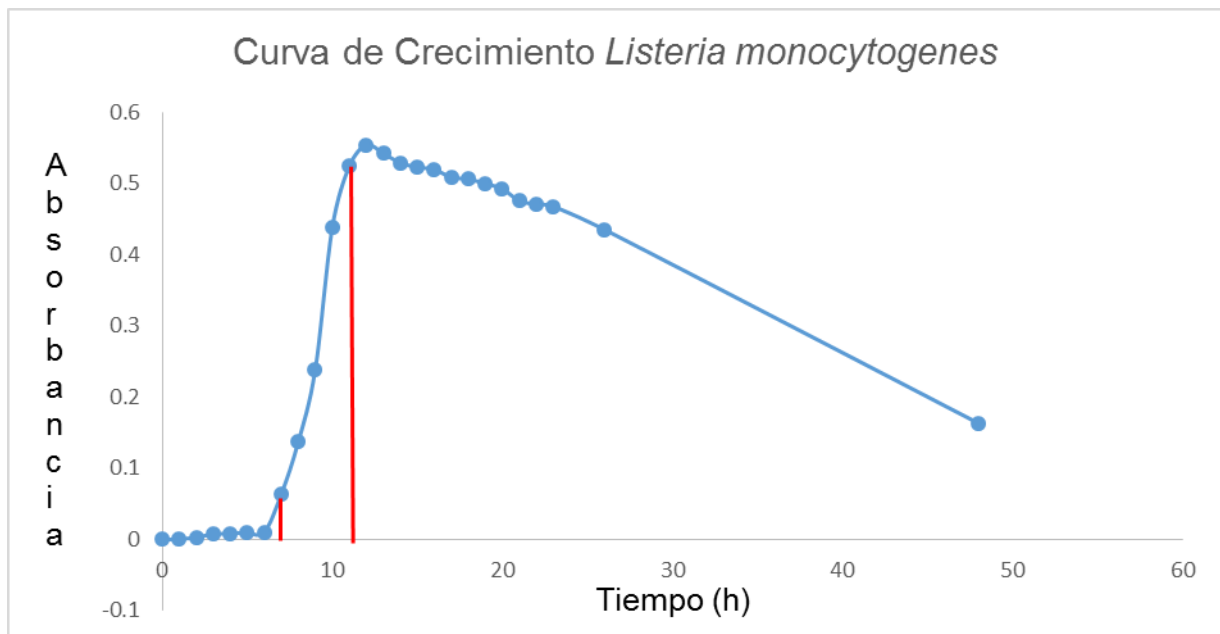


Figura 11. Curva de crecimiento de *L. monocytogenes* ATCC 15313 en medio LB.

## 7.2 Cuantificación de la proteína de la miel de *Melipona beechei* por el método de Bradford

Ya obtenida la proteína presente en la miel se procedió a determinar la cuantificación de proteína por el método descrito por Bradford; para esto primero se realizó una curva estándar de BSA como se puede observar en la figura 12, obteniendo en la curva la ecuación de la recta ( $y = mx + b$ ), la cual fue la siguiente:  $y = 0.0542x + 0.1967$ , con una  $r^2 = 0.9964$ , lo cual nos representa la linealidad de la curva estándar de BSA.

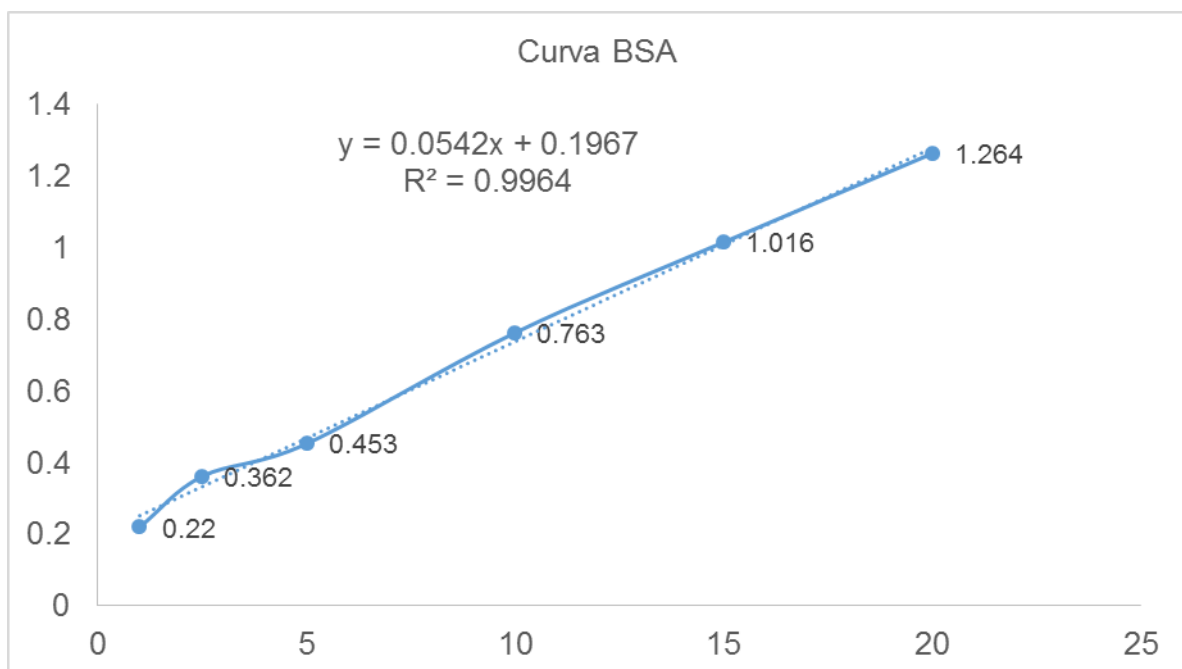


Figura 12. Curva estándar de BSA para la cuantificación por el método de Bradford.

Una vez obtenida la curva estándar de BSA se procedió a cuantificar la proteína de la miel de *Melipona beecheii*, logrando obtener  $1.7 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , con un volumen de 3 mL y una concentración final de 5.1 mg. La concentración es determinante para conocer la cantidad de proteína que se empleará en los diversos análisis.



### 7.3 Determinación del perfil proteico por electroforesis

Con el fin de autenticar que la miel con la que se está trabajando es de *Melipona beecheii* se utilizó el sistema SDS-PAGE, donde se logró observar en el gel siete bandas (figura 13), que van desde los 10 KDa hasta los 100 KDa, siendo la proteína más abundante la de 25 KDa, el perfil proteico coincide con el reportado por Ramón-Sierra (2015). De igual manera, realizar el sistema SDS-PAGE nos permite visualizar si la extracción realizada por el método descrito por Schmitzova´ se llevó a cabo de manera correcta, o bien si la proteína no se encuentra degradada; y como se puede observar en la figura 13 se visualizan bandas nítidas e integras lo cual nos indica que las proteínas de la miel de *Melipona beecheii* se encuentran estables y el extracto proteico pudo ser utilizado en las diversas pruebas antimicrobianas contra *Listeria monocytogenes* ATCC 15313.

Las bandas de menor peso molecular podrían tratarse de péptidos antimicrobianos. Este resultado coincide con el obtenido por Hancock en el 2007, que reportó 2 péptidos antimicrobianos aislados del aparato digestivo de la abeja, mientras que en el 2011 Kwakman reportó una defensina aislada de una miel de *Apis mellifera* Won et al, 2009 purificaron una proteína de miel de abeja de Corea con un peso de 49 KDa la cual es una proteína de defensa que poseen las abejas (*Apis mellifera*), esta proteína también la reporta Kamakura en el 2001, además de otra con un peso de 57 KDa en mieles de Brasil las cuales presentaron actividad antimicrobiana.

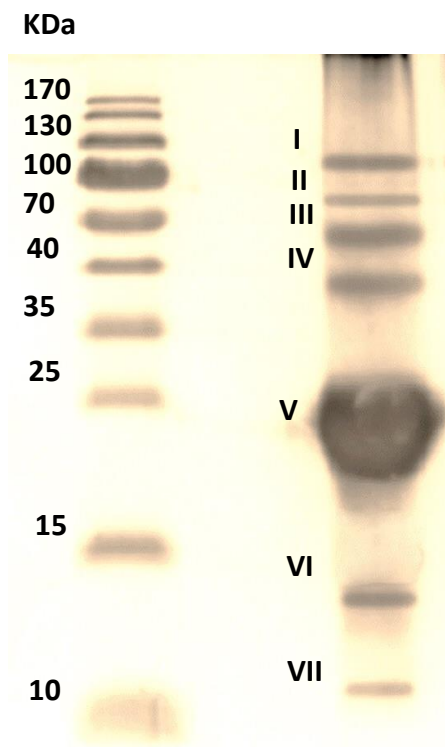


Figura 13. Perfil proteico de la miel de *Melipona beecheii* en gel de poliacrilamida al 12% con una concentración de proteína de 2 µg.

#### **7.4 Cuantificación de los fenoles de la miel de *Melipona beecheii* por método Folin-Ciocalteu**

Se determinó el contenido fenólico de la miel de *Melipona* mediante el método de Folin-Ciocalteu descrito por Saravana y Mandal en el 2009. El cual consiste en una reacción de los compuestos fenólicos presentes en la miel con el reactivo de Folin-Ciocalteu obteniendo un color azul. Como patrón se empleó una curva de calibración de ácido gálico de concentraciones de 25-200 mg/L.

Se obtuvo una concentración de extracto fenólico de 119.2 µg equivalente de ácido gálico por µL de muestra presente en la miel de *Melipona beecheii*. Existen diversos reportes de extractos fenólicos en diversas mieles como es el caso de Martínez (2011) reporta una concentración de fenoles de 51.53 mg de EAG/100 g de miel de *Melipona beecheii*, Muñoz (2007) reporta que en *Apis mellifera* hay presente una concentración de 0.01-13.8 mg de EAG/100 g de miel. Vattuone (2007) reportó de fenoles de mieles de *Tetragonisca angustula fiebrigi* y *Plebeia wittmanni* con concentraciones de 41.8-44 y 28.3-32.1 mg de EAG/100 g respectivamente para cada miel, por otra parte Saravana y Mandal (2009) reportó una concentración de fenoles de 29.96-65.08 mg de EAG/100 g en miel multifloral comercial, mientras que Lachman (2010) reportó fenoles con una concentración de 3.92-9.54 mg de EAG/100 g de miel multifloral; la miel de *Melipona beecheii* de este estudio presenta una concentración de 59.6 mg de EAG/100 g de miel concluyendo que es mayor a las mencionadas anteriormente debido a que el contenido de fenoles en la miel varía dependiendo el tipo de planta que visiten las abejas.

#### **7.5 Determinación de la actividad antimicrobiana de la miel de *Melipona beecheii* y sus compuestos fenólicos y proteicos mediante difusión en disco.**

En la determinación de la actividad antimicrobiana por método de difusión en disco se utilizó la miel de *Melipona* diluida con agua destilada estéril en concentraciones de 10%, 20%, 40% y 80%; extracto fenólico y proteico obtenido de la miel y se preparó un inóculo de la cepa *Listeria monocytogenes ATCC 15313* ajustado a 0.5 de la escala de McFarland.

Zamora en 2013; evaluó la actividad antimicrobiana con miel de *A. mellifera*, *T. angustula* y *M. beecheii* contra diversos microorganismos patógenos entre ellos *L. monocytogenes*. El ensayo fue realizado por pocillo en agar Mueller Hilton tal como lo describe Mitscher et al. (1972); las concentraciones evaluadas de miel fueron de 12.5, 25, 50 y 75 % (v/v) donde las mieles evaluadas contra *L. monocytogenes* lograron inhibir a este patógeno en la concentración de 50% (v/v); la miel que obtuvo mayor halo de inhibición fue la de *M. beecheii*, seguida por la *T. angustula* y la que dio menor inhibición fue la de *A. mellifera*. Por otra parte Estrada en 2005, realizó un estudio donde evaluó la actividad antimicrobiana de la miel de Costa Rica contra diversos patógenos; entre ellos *L. monocytogenes*; probó diversas concentraciones de miel, (6.25, 12.5, 25, 50, 75 y 100 % v/v); de igual manera el ensayo fue realizado por pocillo en agar Mueller Hilton descrito por Mitscher; el resultado obtenido en este estudio es que de 25 mieles evaluadas solo el 44% de las mieles inhibió al 75% v/v y el 20% inhibió al 50% v/v a *L. monocytogenes*.

En el ensayo realizado en el presente trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de la miel de *M. beecheii* contra *Listeria monocytogenes* mediante difusión en disco descrito por Kirby-Bauer (1966); donde en 80% se obtuvo un halo de inhibición de 1.8 cm y para 40% fue de 1.2 cm (Fig. 14), mientras que el halo de inhibición con el control que en este caso fue la Ampicilina se obtuvo una inhibición de 1.7 cm, se puede asumir que la miel al 40% aún logra inhibir el crecimiento del microorganismo y que la miel al 80% presenta mayor diámetro de inhibición que la ampicilina, sugiriendo que la miel a este porcentaje inhibe de manera adecuada el crecimiento del microorganismo patógeno. Dentro de las propiedades intrínsecas de la miel se puede destacar que tiene un pH ácido (entre 3.4 y 6.1), una alta osmolaridad y una

actividad de agua baja (entre 0.56 y 0.62), dichas características son capaces de inhibir a las bacterias.

Los resultados obtenidos tanto por Zamora (2013) como por Estrada (2005) sobre la miel de abeja con o sin aguijón contra diversos microorganismos demuestran que las mieles presentan un efecto inhibitorio contra las bacterias tanto de forma pura como diluida poniendo de manifiesto que la actividad antimicrobiana de la miel no sólo se debe a las características físico-químicas, sino también a otros factores incluyendo la presencia de ácidos aromáticos y volátiles, la presencia del peróxido de hidrógeno y las proteínas presentes en la miel (Estevinho et al, 2008).

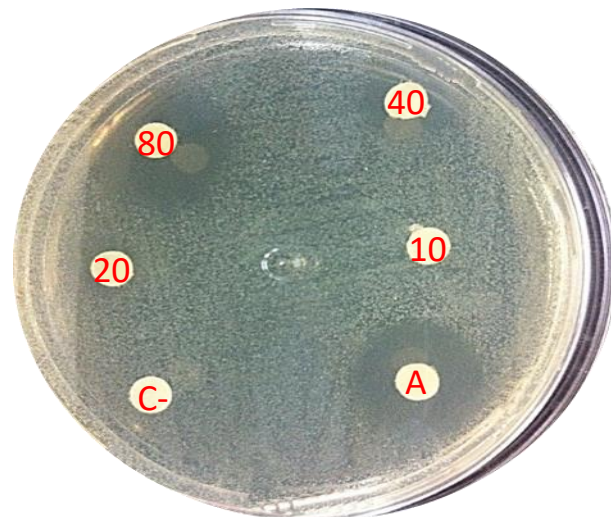


Figura 14. Actividad antimicrobiana de la miel de *Melipona beecheii* contra *L. monocytogenes* 15313, donde A es 50 µg de ampicilina, C- es agua estéril, 10, 20, 40 y 80% v/v es el porcentaje de la miel diluida con agua estéril.

De igual manera se realizó la actividad antimicrobiana mediante difusión en disco con el extracto proteico y fenólico de miel de *Melipona* demostrando que ambos extractos poseen actividad antimicrobiana ya que como se puede observar en la figura 15 se visualiza un halo, indicando que estos componentes de la miel logran inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. Para el extracto

proteico se obtuvo un halo de inhibición de 0.85 cm en una concentración de 80  $\mu\text{g}$ , mientras que con una concentración de 100  $\mu\text{g}$  se obtuvo un halo de 1.1 cm y por último un halo de inhibición de 1.65 cm con una concentración de 120  $\mu\text{g}$ ; mientras que para el extracto fenólico con una concentración de 550  $\mu\text{g}$  se ve un halo de inhibición de 0.77 cm, mientras que con una concentración de 620  $\mu\text{g}$  se observa una inhibición de 1.57 cm. Con lo anterior se puede determinar que ambos compuestos inhiben el crecimiento de *L. monocytogenes* ATCC 15313.

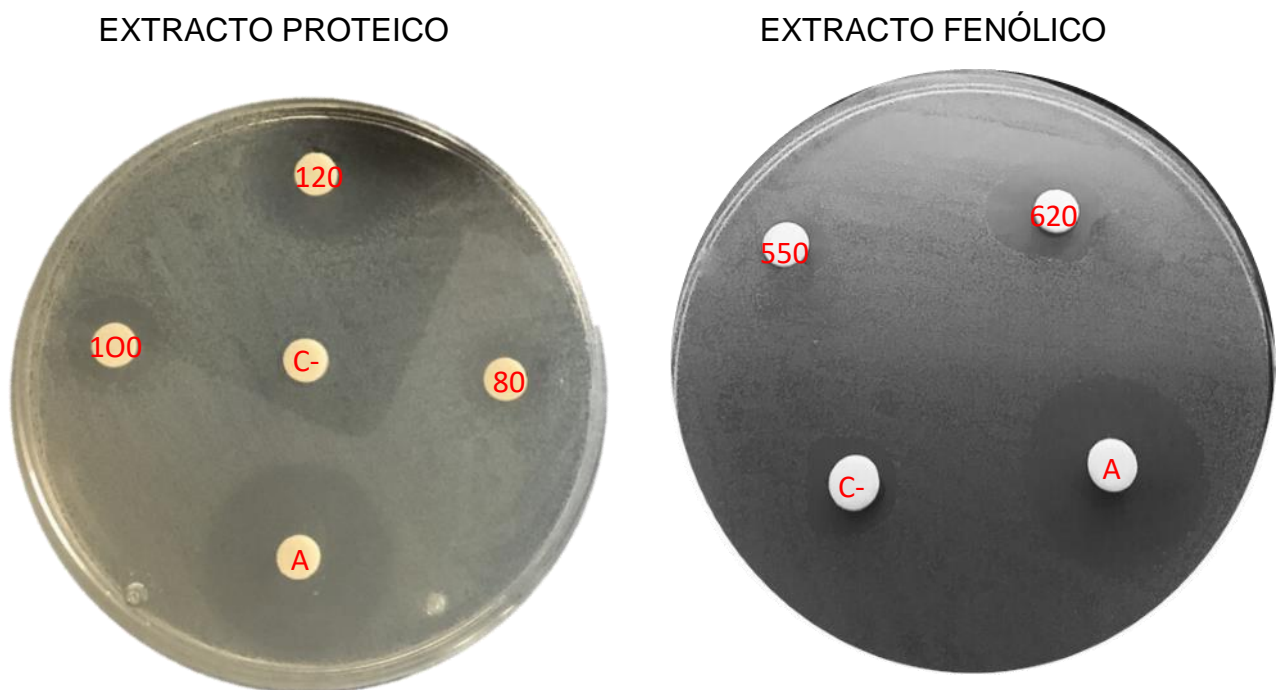


Figura 15. Actividad antimicrobiana del extracto proteico y fenólico de la miel de *Melipona beecheii* contra *L. monocytogenes* 15313, donde para el extracto proteico A es 30  $\mu\text{g}$  de ampicilina, C- es buffer de fosfatos estéril, 80, 100 y 120 son microgramos del extracto de proteína; para el extracto fenólico A es 30  $\mu\text{g}$  de ampicilina, C- es metanol, 550 y 620 son microgramos de extracto fenólico EAG.

Estudios previos han propuesto posibles mecanismos de acción de los compuestos fenólicos. Sin embargo aún no son muy claros. La actividad antimicrobiana de estos compuestos puede ser atribuida a su capacidad de alterar la permeabilidad celular, lo cual puede promover una pérdida de macromoléculas al interior de la célula. Algunos autores sugieren que estos compuestos interrumpen algunas funciones de la membrana como transporte de electrones, intercambio de nutrientes ocasionando una deformación estructural; también interfieren en la síntesis de proteínas y la actividad enzimática, ocasionando la muerte celular (Bajpai et al, 2008. Rico-Muñoz et al, 1987).

Por otra parte hay estudios que han mostrado que péptidos como las bacteriocinas poseen actividad antimicrobiana; las bacterias Gram-positivas se caracterizan por poseer un alto contenido en lípidos aniónicos en su membrana, en este caso el modo de acción de las bacteriocinas es la unión inicial a la membrana bacteriana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y las bacteriocinas con su carga neta positiva localizada en uno de sus extremos (extremo C-terminal de la nisina, extremo N-terminal de la pediocina); después se produce la inserción de las bacteriocinas en la bicapa lipídica, en el caso de la nisina esta inserción se realiza por su extremo N-terminal (Moll et al, 1999) y en el caso de la pediocina, a través de su  $\alpha$ -hélice transmembranal del extremo C-terminal (Ennahar et al, 2000). De este modo se forman poros en la membrana bacteriana, la cual queda permeabilizada, la célula empieza a perder iones y metabolitos fundamentales para su supervivencia y eventualmente se produce la muerte bacteriana, esto debido muy probablemente a vesiculación del protoplasma, la formación de poros y la desintegración completa de la célula (Bizani et al, 2005). Otro aspecto importante es

la inhibición de la biosíntesis del ADN que conlleva a la muerte celular, como un mecanismo secundario de estos péptidos antimicrobianos (Brötz y Sahl 2000).

Se ha visto que las bacteriocinas de clase II son péptidos activos contra *Listeria*, tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys) (Kemperman et al, 2003), ejemplos de éstas son pediocina PA-1 y sakacina P.

Hay estudios que demuestran que la cecropina que es un péptido de poco más de 3 KDa, ha logrado inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas y se produce al inyectar bacterias a la pupa de *Hyalophoa cecropia* (Boman, 1995). Este tipo de péptidos tienen un alto contenido en prolina y se encuentran presentes en varios grupos de insectos.

Benkerroum y Sandine (1988) realizaron un estudio de difusión en agar con el péptido nisina contra diversas cepas de *Listeria monocytogenes* en donde se determinó que la nisina logra inhibir a estas cepas; algunas cepas mostraron mayor susceptibilidad; el halo con mayor inhibición fue de 1.8 cm y el de menor fue de 1 cm.

También se encuentran las defensinas como péptidos catiónicos; contienen 3 puentes disulfuro y presentan alta especificidad contra bacterias Gram positivas. Otros péptidos con actividad antimicrobiana son la apidaecina, abaecina y la royalisina de la abeja *Apis mellífera*, también con alto contenido de prolina; en la actualidad no se han identificado los péptidos presentes en la miel de *Melipona beecheii*; sin embargo como se puede observar en la figura 15 el extracto proteico posee actividad antimicrobiana contra la cepa de *Listeria monocytogenes* por tal



motivo se sugiere que uno o varios péptidos o proteínas presentes en el extracto proteico de la miel de *Melipona beecheii* tiene la capacidad de ser un agente antimicrobiano.

## **7.6 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) mediante microdiluciones**

Durante la determinación de la concentración mínima inhibitoria de la miel de *Melipona beecheii* se tomó la lectura a las 24 horas de incubación con el fin de determinar la inhibición del microorganismo. La cantidad mínima necesaria para inhibir el crecimiento de  $1 \times 10^6$  UFC (unidades formadoras de colonias) de *L. monocytogenes* ATCC 15313 fue la dilución del 17% de la miel (Fig. 16), cabe resaltar que es el primer reporte de concentración mínima inhibitoria de este microorganismo con la miel de *Melipona beecheii*.

Martínez en el 2011, reporta la concentración mínima inhibitoria contra cepas de colección de *S. aureus* y *E. coli* reportando 6% y 16% respectivamente para cada microorganismo utilizando como antimicrobiano la miel de *Melipona beecheii*; para cada microorganismo se ve una CMI distinta, esto puede deberse a que cada microorganismo posee una estructura y fisiología diferente presentando mayor o menor sensibilidad a la miel; sin embargo un resultado para *Listeria monocytogenes* de 17% de CMI es un parámetro que demuestra que este patógeno que se encuentra fuertemente involucrado en las enfermedades transmitidas por los alimentos es sensible a este agente antimicrobiano; así como a una concentración de 85 µg/mL del extracto proteico y de 591 µg EAG/mL del extracto fenólico.

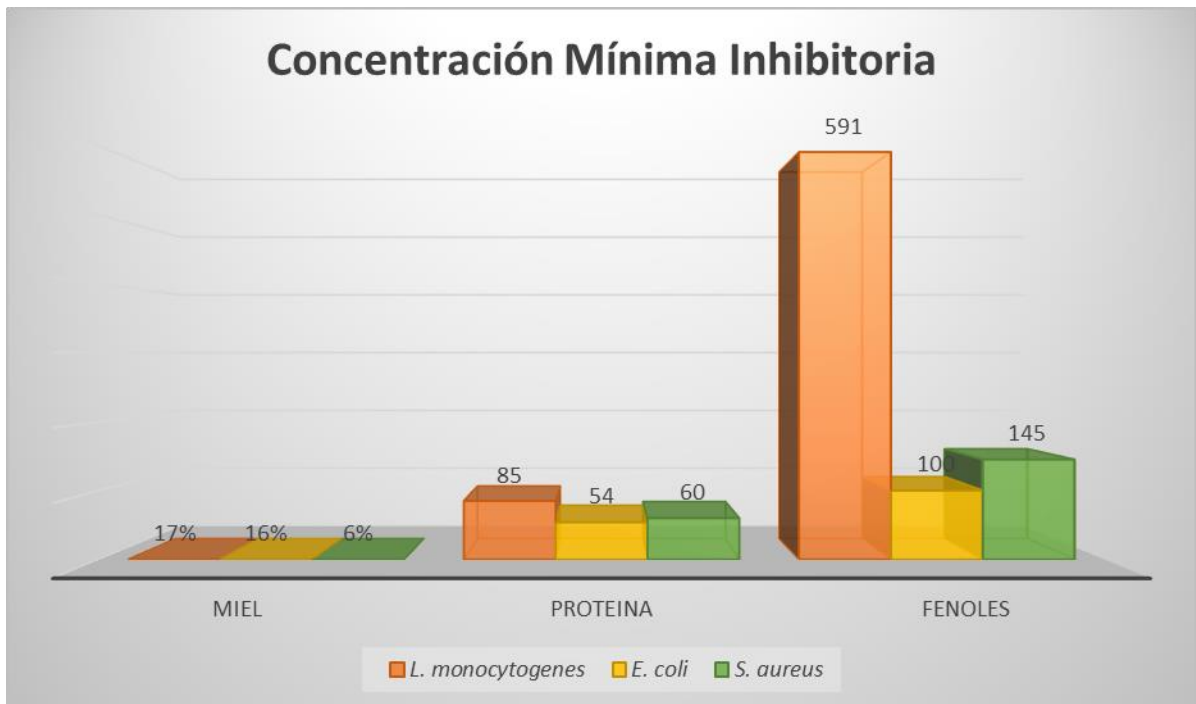


Figura 16. Concentración mínima inhibitoria para *L. monocytogenes* 15313 de la miel, el extracto proteico y fenólico de *Melipona beecheii*. (Martínez, 2011 y Ramón, 2011).

Como se puede observar en la figura 16 tanto la miel como el extracto proteico y fenólico presentan actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* ya que a las 24 horas no hay crecimiento del microorganismo; estudios previos como el de Martínez y el de Ramón con cepas de colección de *E. coli* y *S. aureus* muestran que tanto el extracto proteico como el fenólico inhiben a dichos microorganismos a diferentes concentraciones; enfatizando que la miel a bajo porcentaje es la que presenta mejor actividad antimicrobiana contra estos microorganismos debido a que al ser una mezcla de sustancias heterogéneas actúe de manera sinérgica con los demás compuestos y con diferentes mecanismos de acción sobre las bacterias.

## **7.7 Cinética de muerte de *Listeria monocytogenes* con miel de *Melipona beecheii* y porcentaje de muerte con el extracto fenólico**

Con la finalidad de determinar si la miel de *Melipona beecheii* y su extracto fenólico disminuyen la viabilidad de *Listeria monocytogenes* se preparó un inóculo de la cepa *L. monocytogenes* 15313 a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC y se inocularon en medio Mueller Hinton con la concentración 1x de la miel la cual corresponde al 17% y 0.5x que corresponde al 8.5%; se tomaron 100  $\mu$ L de las muestras a evaluar para cada tiempo (0, 0.5, 1, 3 y 24 horas) y se inocularon en agar LB; las placas se incubaron a 37°C por 24 horas para después realizar el conteo de las colonias.

Como se puede observar en la figura 17, para la concentración 1x de miel al tiempo cero ya se encontraba una inhibición de 98.48% mientras que para la concentración 0.5x la inhibición fue menor obteniendo un resultado de 85.71%; a los 30 minutos en la concentración 1x la inhibición se mantiene; mientras que para la concentración de 0.5x hubo un ligero aumento en la inhibición el cual resulto de 85.98%; a la hora en la concentración 1x se presenta un ligero aumento en la inhibición obteniendo un 98.68% y en la concentración 0.5x hay un incremento mayo con respecto a los 30 minutos en la cual se presenta una inhibición de 93.85%; a la hora 3 se presenta una inhibición de 99.43% con respecto a la concentración 1x, mientras que para la concentración 0.5x es de 99% y para las 24 horas se da una inhibición del 100% y de 99% con respecto a las concentraciones 1x y 0.5x respectivamente; con estos resultados se demuestra que *L. monocytogenes* es susceptible a la miel y está ejerce un efecto bactericida contra la bacteria.

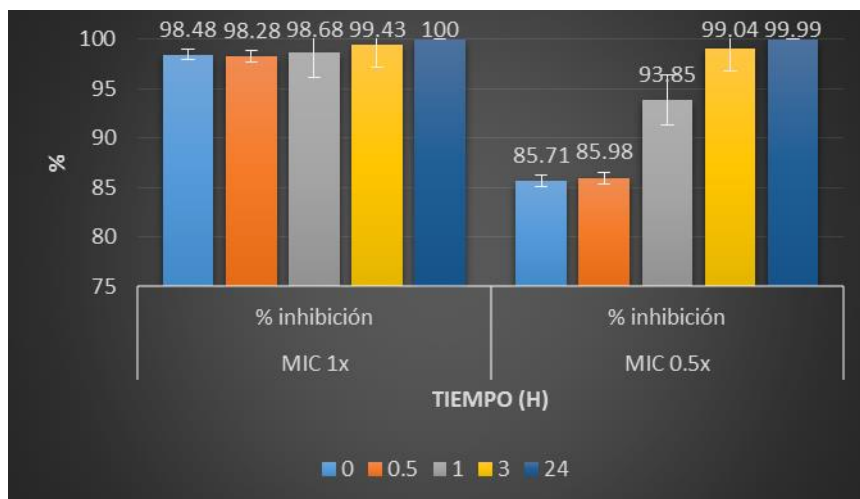


Figura 17. Cinética de muerte de *L. monocytogenes* con miel de *Melipona beecheii* en concentración 0.5x (8.5% v/v) y 1x (17% v/v)

Por otra parte se determinó el porcentaje de muerte de *L. monocytogenes* a las 24 horas contra el extracto fenólico de la miel de *Melipona* en donde se observa claramente en la figura 18 que con una concentración 1x (591  $\mu\text{g}$  EAG/mL ) y 2x (1182  $\mu\text{g}$  EAG/mL) del extracto fenólico ejerce una acción bactericida contra la bacteria obteniendo un 100% de inhibición; mientras que en una concentración 0.5x (295.5  $\mu\text{g}$  EAG/mL) solo ejerce una inhibición de 18.66% por lo tanto el efecto que ejerce a esta concentración solo es bacteriostático.

En comparación con la miel y el extracto fenólico a concentración 0.5x hay una notable diferencia y esto puede deberse a que en los componentes presentes en la miel actúen de manera sinérgica y los compuestos separados sí presenten un efecto antimicrobiano pero se requiera de mayor concentración de compuesto.

Un estudio realizado por Gill y Holley (2004) donde utiliza eugenol y cinamaldehído (ambos compuestos fenólicos) demostraron que *Listeria monocytogenes* es susceptible a ambos compuestos en una concentración de 5mM y 30 mM

respectivamente; además se cree que el eugenol inhibe la ATPasa y por lo tanto el metabolismo energético de *Listeria monocytogenes* se ve afectado; al ser compuestos de naturaleza fenólica se puede predecir que al igual que los compuestos fenólicos presentes en la miel poseen actividad antimicrobiana de manera similar y por lo tanto logran inhibir de manera bactericida a *Listeria monocytogenes*.

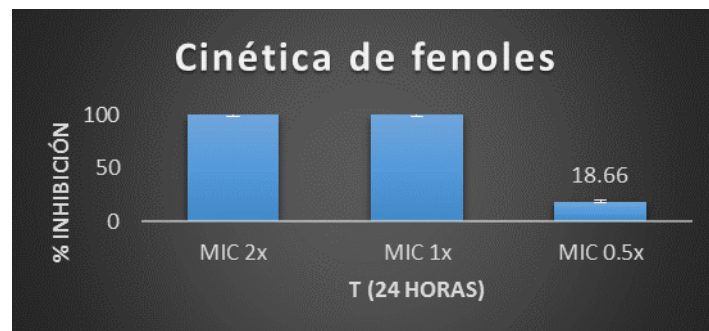


Figura 18. Porcentaje de muerte de *L. monocytogenes* con extracto fenólico de miel de *Melipona beecheii* en concentración 0.5x, 1x y 2x

### **7.8 Extracción de ADN genómico de *L. monocytogenes* ATCC 15313 y detección de genes housekeeping y genes de virulencia**

Con el fin de validar que en la cepa se encuentren presentes los genes de interés a evaluar (genes housekeeping y de virulencia) se obtuvo el ADN genómico de *L. monocytogenes* ATCC 15313, el cual se observa en la figura 19 una banda de alto peso molecular, íntegra, nítida, indicando que la muestra no presenta degradación; además es una extracción correcta ya que no hay presencia de bandas de menor peso molecular.

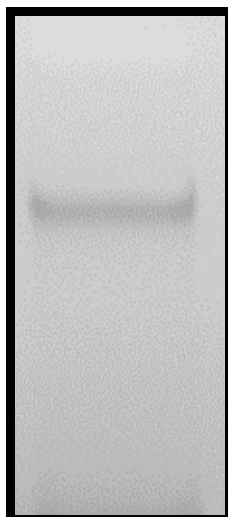


Figura 19. ADN de *L. monocytogenes* 15313 en gel de agarosa al 0.8%

En la tabla 3 se muestran los genes housekeeping y de virulencia a evaluar mostrando su tamaño esperado.

Tabla 3. Genes housekeeping y de virulencia especificando su uso, función biológica y tamaño esperado de amplificación.

GEN	PRODUCTO	DESCRIPCIÓN
Gap	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	Es una enzima presente en la glucólisis, proceso en donde se va a utilizar una molécula de glucosa y se va a oxidar para obtener dos moléculas de piruvato y además se va a obtener energía en forma de ATP. La enzima G3PDH, cataliza la reacción por la cual se oxida el gliceraldehido 3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato. (Nelson y Cox, 2009)

prs	Fosforribosil pirofosfato sintetasa	Esta enzima está implicada en la biosíntesis de bases púricas y pirimidínicas ya que por acción de esta enzima se va a generar el precursor fosforribosil pirofosfato, el cual se sintetiza a partir de ribosa 5-fosfato y ATP (Nelson y Cox, 2009)
RplD	Proteína ribosomal L4	Proteína ribosómica L4 reside en la subunidad 50s del ribosoma, cerca del centro de peptidil transferasa del ribosoma bacteriano y puede, junto con rRNA y proteínas L2 y L3, participar activamente en la catálisis de la formación del enlace peptídico. <i>Escherichia coli</i> L4 es también un regulador de retroalimentación autógena de la transcripción y traducción de 11 genes del operón S10. Proteína L4 está íntimamente involucrado con la región de ARN peptidil transferasa y puede participar activamente en la catálisis de la formación del enlace peptídico. También sugieren L4 como un jugador importante en el mantenimiento de la estructura de los ribosomas (Worbs et al, 2000)
RpoB	ARN polimerasa sub unidad B	La ARN polimerasa está comprendida de cinco subunidades: 2 alfa, beta, beta prima y sigma. Todo ese complejo es denominado holoenzima. La holoenzima tiene la capacidad de unirse a la cadena molde de ADN e iniciar la transcripción. La sub unidad

		beta forma el sitio catalítico de la enzima (Murray, 2007)
recA	Proteína de recombinación ADN	Es un importante factor en la reparación del ADN, además es responsable de activar la respuesta SOS que es una vía conservada implicada en la reparación del ADN de las horquillas de replicación. RecA contribuye a la supervivencia de las condiciones que limitan el tracto gastro-intestinal y la translocación a través de la barrera intestinal. La respuesta RecA y SOS son generalmente activados por eventos que dan lugar a la exposición de los ADN de cadena sencilla, por ejemplo la exposición a especies reactivas de oxígeno. (Van der Veen, 2011)
ActA	Proteína inductora de ensamblaje de actina	Es una proteína localizada en la superficie de la bacteria, que permite a la bacteria a desplazarse eficientemente a través del citosol de la célula del hospedero para invadir células vecinas que aún no han sido infectadas. Se ha observado que las cepas bacterianas deficientes en ActA presentan una menor capacidad de invadir células vecinas (Camejo, 2011)
InIA	Internalina A	Internalina A se encuentra unida de manera covalente al peptidoglicano. Estas proteínas se unen a las proteínas de superficie de las células hospedera, se



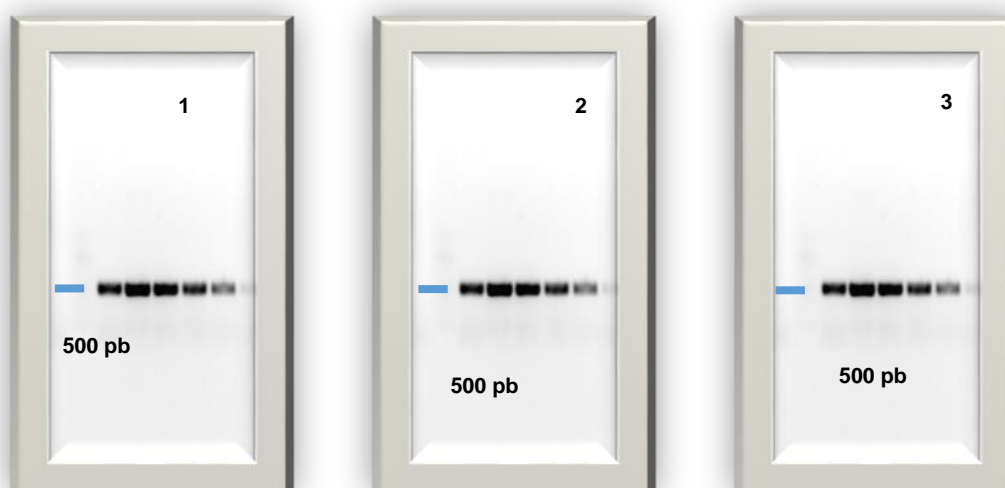
		<p>une al receptor E-cadherina, glicoproteína transmembrana localizada en la superficie basolateral de varios tipos de células, incluyendo el enterocito. Por lo tanto la interacción InIA/E-cadherina es crítica para la invasión del epitelio intestinal y activa una compleja vía de señalización que conduce a la reorganización del citoesqueleto. Para que <i>L. monocytogenes</i> atraviese la barrera intestinal es crucial la participación de InIA. Es un principal factor de virulencia implicada en la invasión celular, es especial en fagocitos (Pizarro-Cerdá, 2006)</p>
InIC	Internalina C	<p>InIC puede ser importante en las etapas posteriores de la infección. Varias observaciones apoyan la importancia de inIC en la infección por: (i) inIC es regulada por PrfA e InIC promueve la invasión de células vecinas. (Dramsi et al, 1997)</p>
Hly	Listeriolisina O	<p>Es una toxina dependiente de colesterol, perteneciente a una gran familia de toxinas formadoras de poros, las citolisinas, propias de las bacterias G+. Al ser secretada por la bacteria, LLO permite el escape del fagolisosoma a través de la formación de poros, evitando la destrucción bacteriana y permitiendo el crecimiento y desarrollo microbiano en el citosol de la célula infectada. Se</p>

		<p>requiere que la LLO se fije al colesterol de la membrana y se polimericen. Existe evidencia de que en ausencia de actividad de LLO la bacteria disminuye notablemente su capacidad invasiva y no es capaz de reproducirse (Gedde, 2000)</p>
PlcA	Fosfatidilinositol fosfolipasa C	<p>Codifica para la fosfolipasa C fosfatidilinositol específica (PI-PLC), la cual media la desestabilización de los fagosomas primarios junto con la LLO. Juega un papel importante en el poder invasivo; se ha demostrado que las bacterias con mutaciones en el gen que codifica para esta enzima son menos virulentas en ratones que las cepas silvestres. Experimentos con cepas mutantes para el gen plcA demuestran que la PI-PLC ayuda en el escape de la primera vacuola fagocítica de macrófagos derivados de médula ósea en, y de la línea celular de macrófagos murinos J774. La infección de células J774 con cepas silvestres de <i>L. monocytogenes</i> desencadena una vía de señalización en la cual la LLO y la PI-PLC cooperan en el desdoblamiento del fosfatidilinositol (PI), componente estructural de la bicapa lipídica de la célula hospedero, para producir diacilglicerol (DAG). El DAG activa la traslocación a la membrana celular de la</p>

		<p>proteína kinasa C <math>\delta</math> (PKC <math>\delta</math>), implicada en la fosforilación y apertura de los canales de calcio en el primer minuto después de la adición de <i>L. monocytogenes</i> sobre las células J774. La movilización de PKC <math>\delta</math> permite la entrada de calcio en el citoplasma, que en combinación con el DAG produce la traslocación de PKC <math>\beta</math>II a endosomas tempranos; lo que ocurre según estudios de inmunofluorescencia entre 30 segundos y 3 minutos después de la infección de células J774 con cepas silvestres de <i>L. monocytogenes</i> (Torres et al, 2005)</p>
PrfA	Factor regulador positivo A	<p>Regula la expresión de los genes de virulencia. PrfA puede regular directamente 10 genes de virulencia. Esta proteína está estructuralmente relacionada con la proteína receptora de AMPc de enterobacterias. PrfA es un homodímero simétrico con 2 promotores organizados en 2 dominios. El dominio N-terminal forma una estructura de barril que sugiere que PrfA está sujeta a alosterismo mediado por ligando; sin embargo, la identidad de este ligando aún no se conoce. El dominio C-terminal tiene forma hélice y es la zona donde se establece contacto con el ADN. Este dímero activa la transcripción al unirse a una secuencia palindrómica de 14 pb, conocida como box-</p>

		PrfA, que esta localizada en la posición -41,5 de los promotores. Participan los promotores prfAP1 y prfAP2 que conducen a la expresión del gen prfA, y genera niveles basales de la proteína PrfA requeridos para la activación de los genes plcA y hly (Kazmierczak et al, 2006)
--	--	--

Se realizaron reacciones de PCR en gradiente de temperatura de 45°C hasta 65°C, con un incremento de 4 °C, esto con el fin de obtener la temperatura óptima a la que amplifica el gen de interés; además de validar que los genes a evaluar se encuentren en el genoma de la bacteria y que los oligos sean específicos para *L. monocytogenes* 15313; a continuación se muestra en la figura 8 los genes housekeeping.



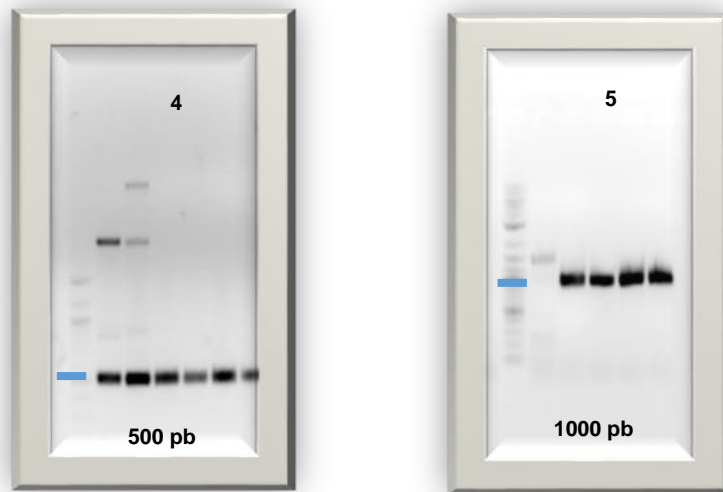


Figura 20. Genes housekeeping específicos para *L. monocytogenes* ATCC 15313. 1) Gap, 2) RecA, 3) RplD, 4) Prs y 5) RpoB

Como se puede observar en la figura 20, el gen Gap, RecA y RplD es específico en todas las temperaturas, ya que sólo amplifican una banda nítida e integra en las distintas temperaturas; mientras que los genes Prs y RpoB presentan inespecificidad en algunas temperaturas ya que presentan más de una banda en un carril en el gel, por eso es importante hacer el análisis en gradiente de temperatura ya que así se conoce la temperatura específica con la que se puede trabajar el gen. En la figura 21 se observa la amplificación de todos los genes de virulencia a evaluar ActA, InlA, Hly, InlC, PlcA y PrfA indicando que dichos genes están presentes en el genoma de la bacteria y también se determinó que los oligos son específicos para la bacteria debido a que amplifican a todas las temperaturas y en una sola banda; mientras que el gen ActA muestra especificidad en solo 2 temperaturas y el gen InlA solo amplifica en 2 temperaturas (53 y 57 °C).

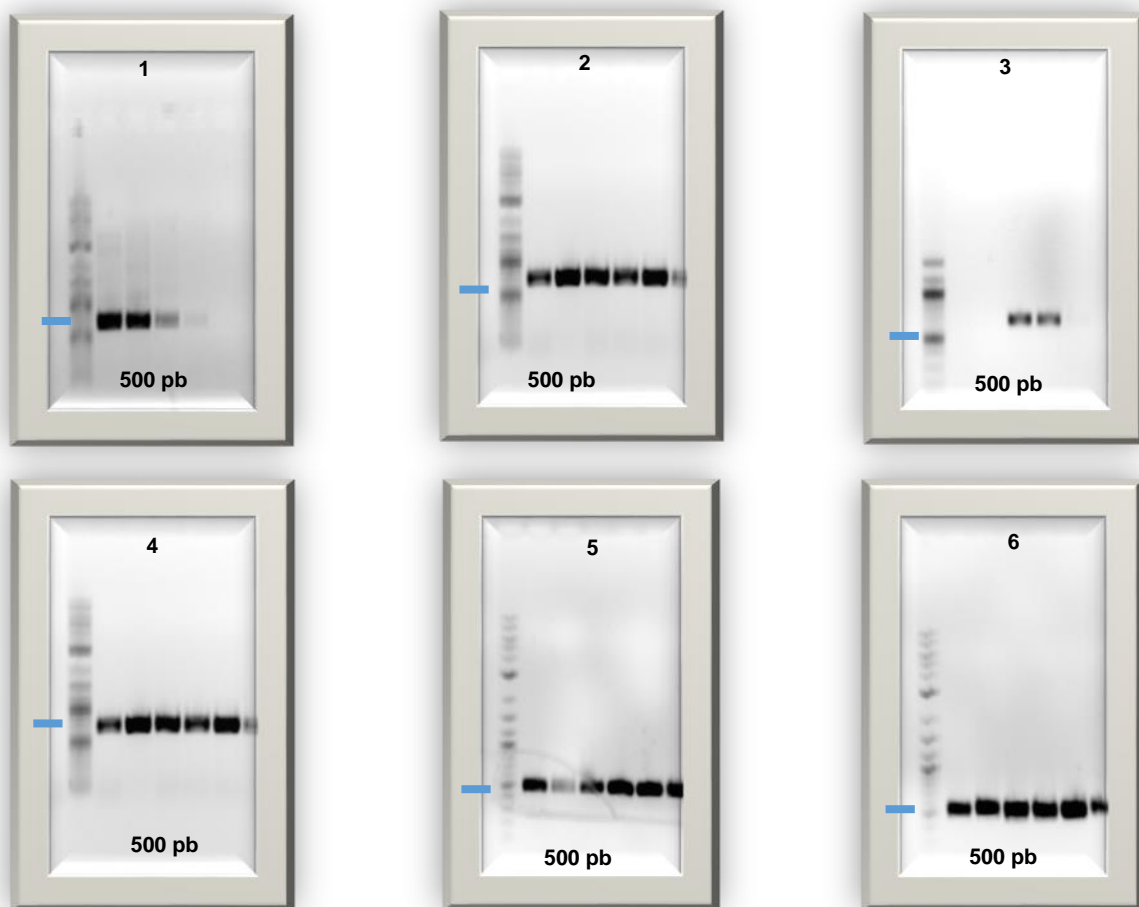


Figura 21. Genes de virulencia específicos para *L. monocytogenes* ATCC 15313. 1) ActA, 2) Hly, 3) InlA, 4) InlC, 5) PlcA y 6) PrfA.

### **7.9 Extracción de ARN de *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 y detección de los genes housekeeping y de virulencia**

Se realizó la extracción de ARN de *Listeria monocytogenes* con el objetivo de que con este material genético sean detectados los mensajeros presentes para la detección de los genes a evaluar. En la figura 22 se observa la extracción del ARN, en la cual se observan 2 bandas nítidas, integras, no se observa degradación del

material genético; estas bandas corresponden al ARN ribosomal; no se observan bandas de mayor peso molecular lo cual indica que no hay presencia de ADN y la muestra es un material genético adecuado para la evaluación de los genes de interés.

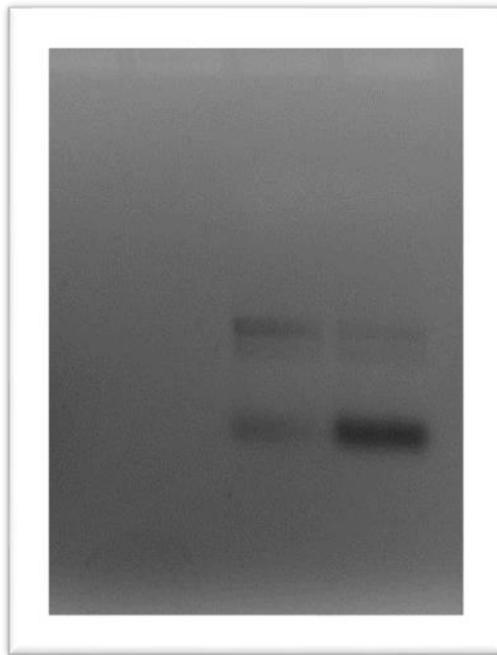
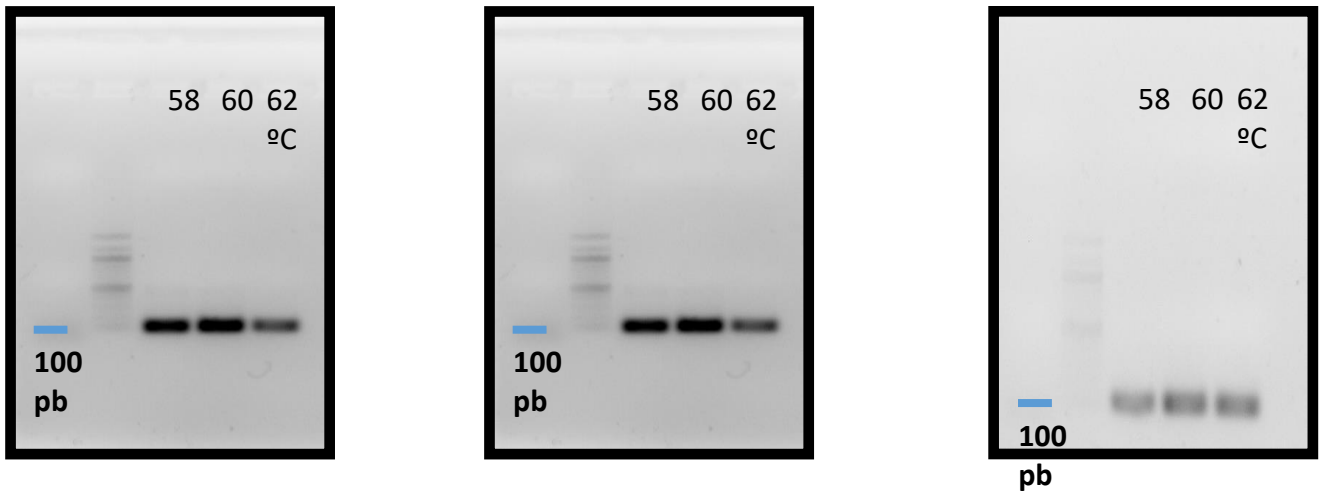


Figura 22. ARN de *L. monocytogenes* 15313 en gel de agarosa al 0.8%

Una vez obtenido el ARN, por medio de un kit de síntesis de ADNc de Thermo scientific se pasó el ARN a ADNc, ya que es más estable y así se evita la degradación. Se realizaron reacciones de PCR en gradiente de temperatura de 58 °C hasta 62 °C, con un incremento de 2 °C, esto con el fin de obtener la temperatura óptima a la que amplifica el gen de interés y ver si el gen se está expresando en el ARN mensajero; además de validar si los oligos de 100 pares de bases son específicos para *L. monocytogenes* 15313; a continuación se muestra en la figura 23 la amplificación de los genes housekeeping del presente estudio.



A)

B)

C)

Figura 23. Detección de genes housekeeping con oligos de 100 pares de bases a partir de cDNA de *L. monocytogenes* ATCC 15313. A) gen Gap, B) gen Prs y C) gen RpoB.

Como se puede observar en la figura 23, los 3 genes housekeeping (Gap, Prs y RpoB) gel A, logran amplificar el gen a partir de ADNc a 100 pares de bases en una temperatura de 58-62 °C, demostrando que dichos genes están presente en el ARN mensajero; además indica que los oligos son específicos debido a que no se presentan amplificaciones a tamaño superior a los 100 pb.

Como se puede observar en la figura 24, los genes de virulencia a estudiar (ActA, InIA, InIC y Hly) amplifican de manera adecuada a 100 pares de bases a partir del cDNA, el cual se obtuvo a partir de ARN, lo cual nos indica que bajo las condiciones en las cuales se creció a la bacteria que en este caso se cultivó en caldo infusión cerebro corazón, suplementado con 5% de suero fetal bovino e incubado a 37 °C se logra la expresión de los factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y con ello



podremos continuar para poder realizar el análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real.

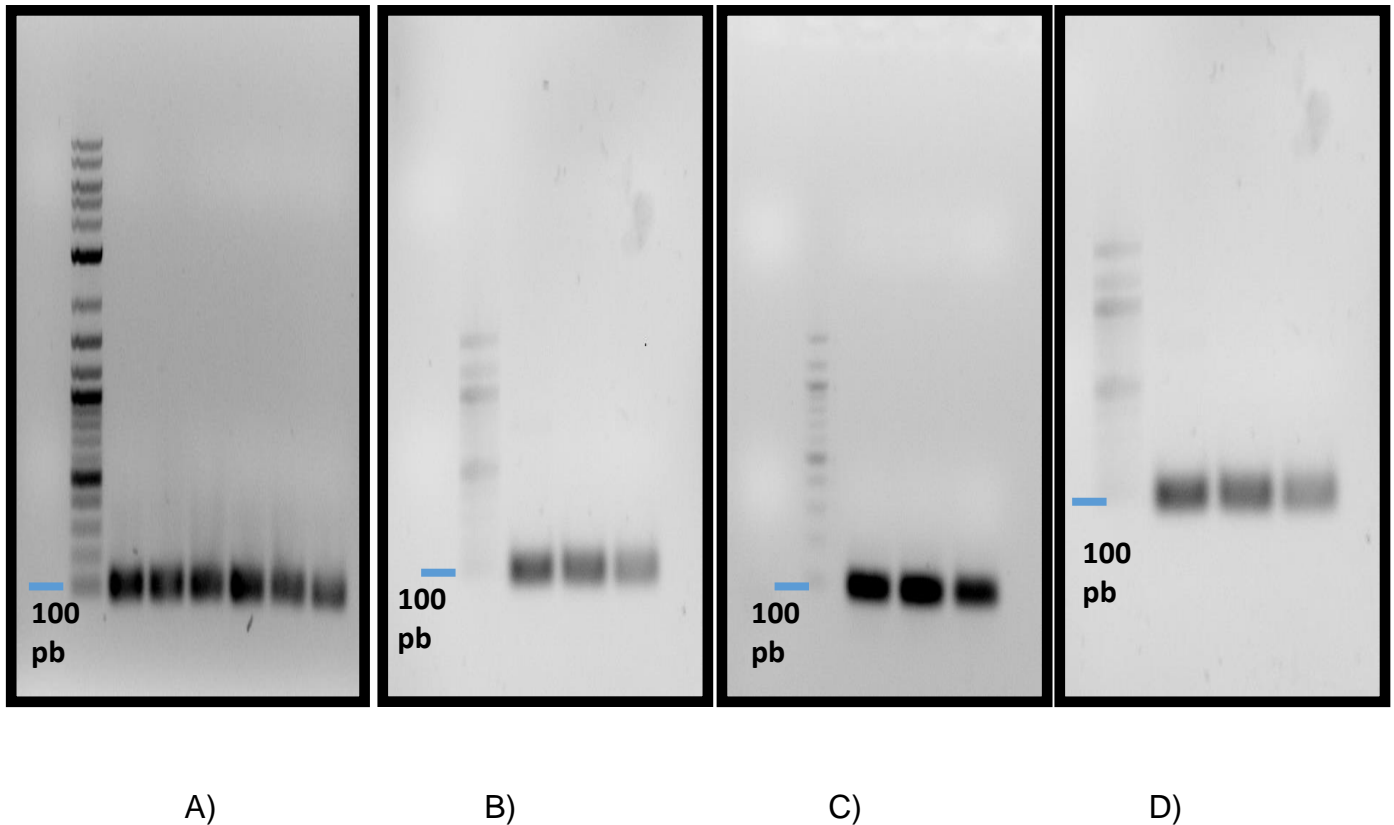


Figura 24. Detección de genes de virulencia con oligos de 100 pares de bases a partir de cDNA de *L. monocytogenes* ATCC 15313. A) gen ActA, B) gen InIA, C) gen InIC y D) gen Hly.

#### 7.10 Variación de la expresión génica de los genes de virulencia con tratamiento de miel y compuestos fenólicos de miel de *Melipona beecheii*.

Las células median sus acciones mediante la inducción o represión de los genes. La expresión genética se encuentra dada por el número de copias de ARN mensajero (ARNm) de un gen en específico. Este material genético es esencial para identificar

la presencia de productos celulares específicos debido a que el ARNm es traducido en los ribosomas para dar lugar a las proteínas. Por lo que se pueden determinar valores referentes a la producción de elementos biológicos si la expresión de los genes de una célula es conocida (McPherson et al., 2008).

Como se puede observar en el presente trabajo se determinó una curva de fusión para los genes a estudiar (Housekeeping: Gap, Prs, RpoB; Virulencia: InIA, ActA) esto con el fin de validar que los oligos sean específicos debido a la gran sensibilidad de esta prueba y como se observa en la figura 25 se muestra una sola amplificación para cada gen; demostrando que los oligos diseñados son específicos y los resultados obtenidos son confiables.

Los resultados de la PCR en tiempo real se basan en la detección y cuantificación de los marcadores fluorescentes a lo largo de la reacción de la PCR. Esto permite conocer la cantidad de fluorescencia emitida durante la fase exponencial de la reacción, donde un aumento significativo del producto de la PCR se correlaciona con la cantidad inicial de ADN o ADNc en el estudio (Walker, 2002).

Para obtener estos resultados, los valores umbral de ciclo (Ct por sus siglas en inglés) deben ser obtenidos. Los valores Ct son determinados por la identificación del ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se intensifica por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de la PCR. En otras palabras, el valor Ct está representado por el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido (Bustin, 2005).

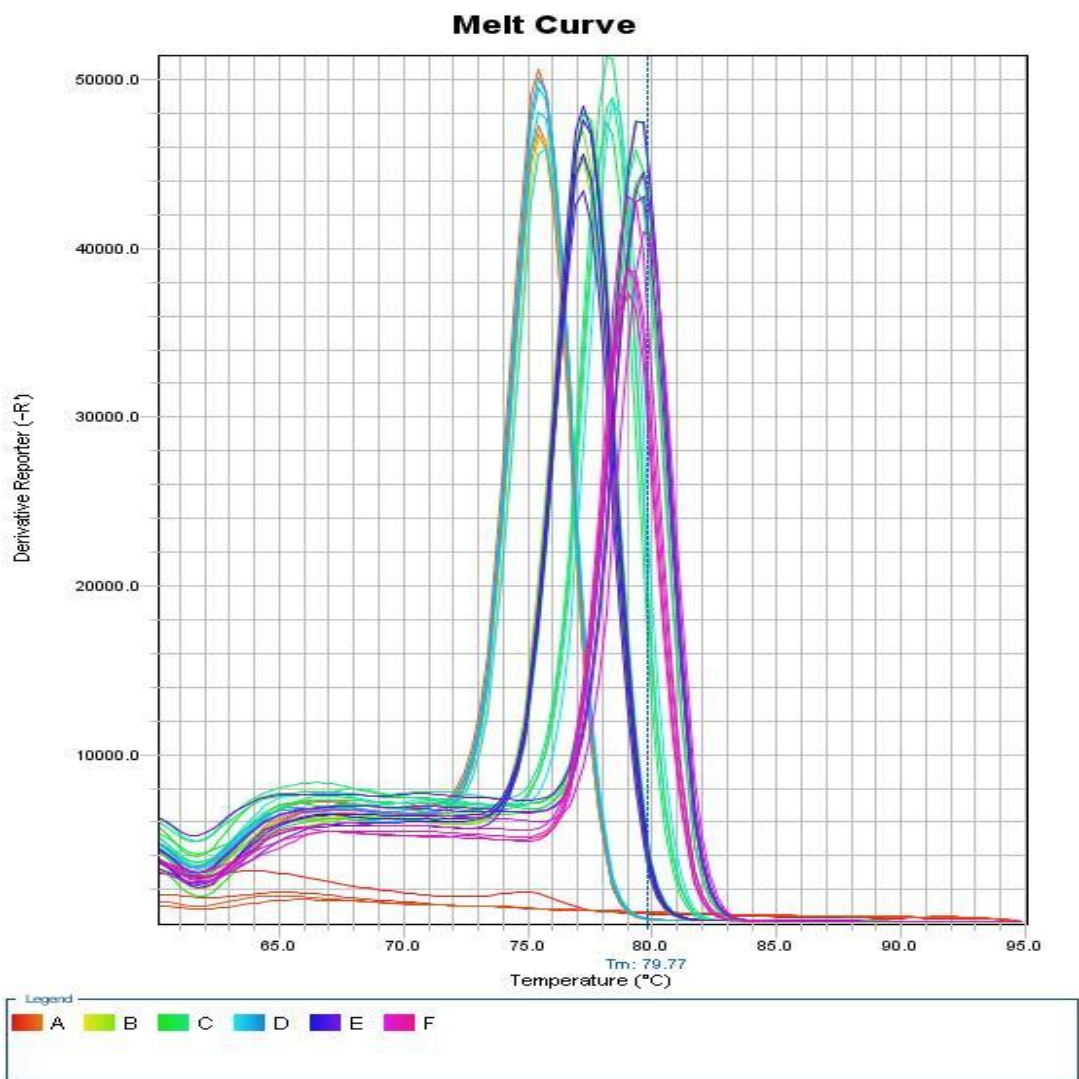


Figura 25. Curva de temperatura de fusión de los genes housekeeping y de virulencia (melt curve). Cada color corresponde a cada gen de interés housekeeping y de virulencia y se demuestra una sola amplificación para cada gen, demostrando que los oligos son específicos y que los resultados obtenidos del equipo son fiables.

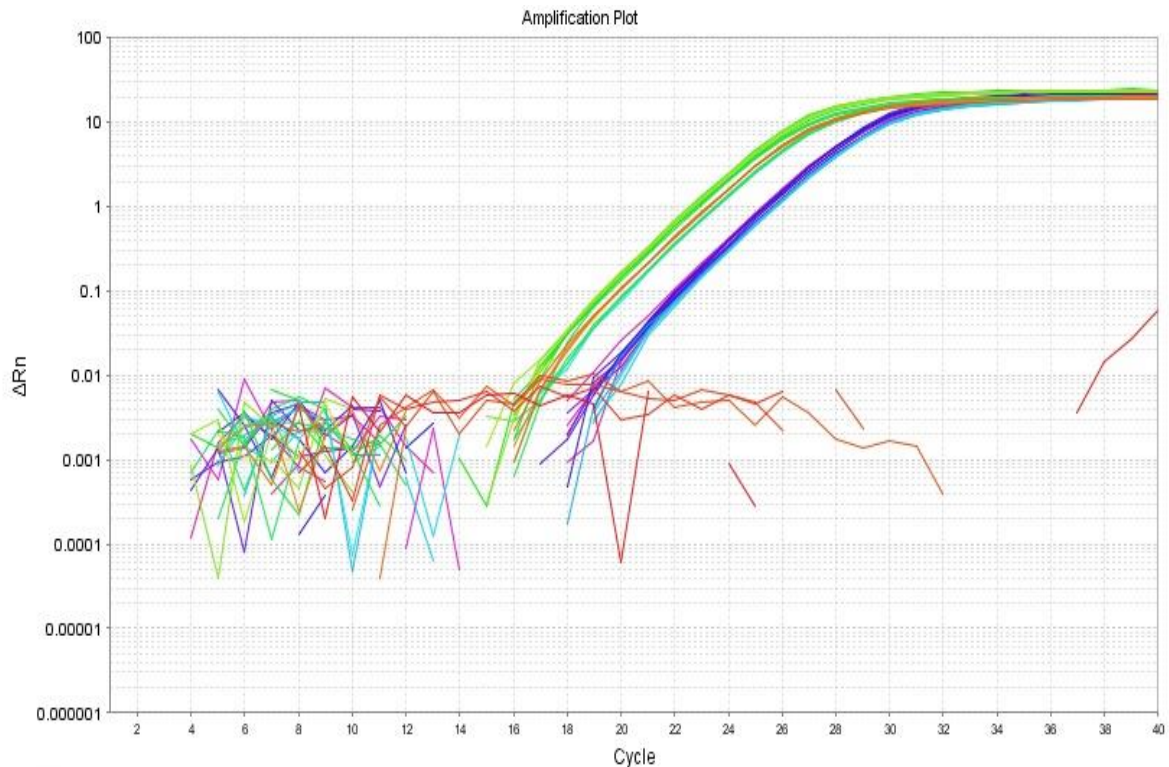


Figura 26. Amplificación de los genes housekeeping y de virulencia para obtener los valores de umbral de ciclo (Ct). Los valores por debajo de 0.01 con respecto a  $\Delta Rn$  corresponden al ruido; cada color corresponde a cada gen housekeeping y de virulencia y la señal es detectada una vez que la intensidad supera el umbral del ruido.

Bajo el tratamiento de dosis sub letal de miel de *Melipona beecheii* al 3% y de 308  $\mu\text{g/mL}$  EAG de extracto fenólico se realizó la cuantificación relativa de expresión genética basándose en la comparación de los valores Ct utilizando un modelo que no requiere la eficiencia de la reacción para acceder a un factor de corrección. Este modelo supone una eficiencia óptima e idéntica (correspondiente al 100%) en la eficiencia de reacción en las PCR en tiempo real tanto del gen en estudio como del gen de referencia (Livak y Schmittgen, 2001). Este es el método 2 delta-delta Ct que sólo es aplicable para una estimación rápida de la proporción relativa de la expresión genética en estudio. El método 2 delta-delta Ct expresa la proporción obtenida de la

relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control. A partir de este modelo se obtuvo que el gen InIA que codifica para la proteína internalina A se vio disminuida su expresión a 0.49 con respecto al gen de referencia RpoB y a 0.80 con respecto al gen de referencia Gap (figura 27); el gen InIA está implicado en la virulencia de *Listeria monocytogenes* como factor de adhesión a la célula huésped para la internalización del microorganismo; en un estudio epidemiológico se analizó la expresión de las internalinas en 300 cepas de *Listeria monocytogenes* obtenidas de pacientes enfermos, de las cuales 61 (20%) correspondían a pacientes embarazadas y las compararon con 150 cepas aisladas desde diferentes alimentos. El 96% de las cepas obtenidas a partir de pacientes enfermos expresaban internalina en su forma completa y funcional, mientras que esto sólo ocurría en el 65% de las cepas obtenidas de alimentos. Las cepas obtenidas de alimentos se asociaron significativamente más a la expresión de una forma truncada y no funcional de internalina, en comparación con las cepas obtenidas de muestras clínicas (Carvajal, 2008). Nightingale et al., (2005) realizaron la detección de cepas de *L. monocytogenes* aisladas de casos clínicos humanos (n = 46), alimentos (n = 118) y animales sanos (n = 58) en los Estados Unidos y se determinó que mutaciones en el gen InIA produjo codones de paro prematuros provocando una respuesta de patogénesis atenuada. Por otra parte Werbrouck et al, (2006) evaluaron varias cepas de *Listeria monocytogenes* de diferentes orígenes para observar la capacidad de invasión in vitro para diversos tipos de células humanas (THP-1 monocítica, Caco-2 enterocítica y HepG2 hepatocíticas) y para los niveles de expresión de genes de virulencia específicos. Para las células THP-1, no se observaron diferencias entre las cepas clínicas y no clínicas de *L. monocytogenes* en capacidad de invasión o en la producción de la citocina proinflamatoria

interleucina-8 (IL-8), mientras que para las células Caco-2 y HepG2 mostraron capacidad de invasión significativamente menor que las cepas no clínicas de *L. monocytogenes*. Además, se demostró que las cepas clínicas inducen niveles más bajos de IL-8 en las células HepG2 que las cepas no clínicas. Los resultados de este estudio indicaron que los niveles de expresión diferencial de InIA e InIB tienen un rol específico en la virulencia de *L. monocytogenes*. Estos autores mencionan que los resultados concuerdan con los de otros estudios, poniendo en evidencia que el rol de la internalinas en la patogénesis de la listeriosis humana es crítico. Van Stelten (2008) menciona que se han identificado mutaciones de codón de parada prematura (PMSC) de origen natural en InIA y se demostró que estas mutaciones son responsables de la atenuación de la virulencia. Realizó un ensayo de genotipificación SNP el cual menciona que puede ser implementado por agencias reguladoras y la industria alimentaria para diferenciar los aislados de *L. monocytogenes* que portan mutaciones de PMSC atenuantes a la virulencia en InIA de cepas que representan el riesgo de salud más significativo. Rousseux et al, (2004) desarrollaron un método de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de PCR (RFLP) para analizar un gran número de cepas con adherencia deteriorada a células epiteliales debido a la expresión de InIA truncada. Al comparar los resultados obtenidos por los autores anteriormente mencionados con el presente estudio donde se determinó que la miel de *Melipona beecheii* disminuye significativamente la InIA por lo tanto la capacidad patogénica del microorganismo se ve afectada severamente disminuyendo su virulencia debido a que el mecanismo de internalización de la bacteria se ve atenuado de manera significativa.

Por otra parte en el análisis bajo el tratamiento de dosis sub letal de 308  $\mu\text{g/mL}$  EAG de extracto fenólico de miel de *Melipona beecheii* no se detectó la represión ni para el gen InIA ni para el gen ActA lo que pudiera indicar que al ser un extracto crudo la interacción entre los componentes fenólicos pueda darse de manera antagonista y no afectar en los niveles de expresión o también pudiera ser que los compuestos fenólicos presentes en el extracto de la miel de *Melipona* no actúen a nivel genético sino sólo se vean involucrados en interacciones con la pared celular de la bacteria ocasionando la lisis del microorganismo.

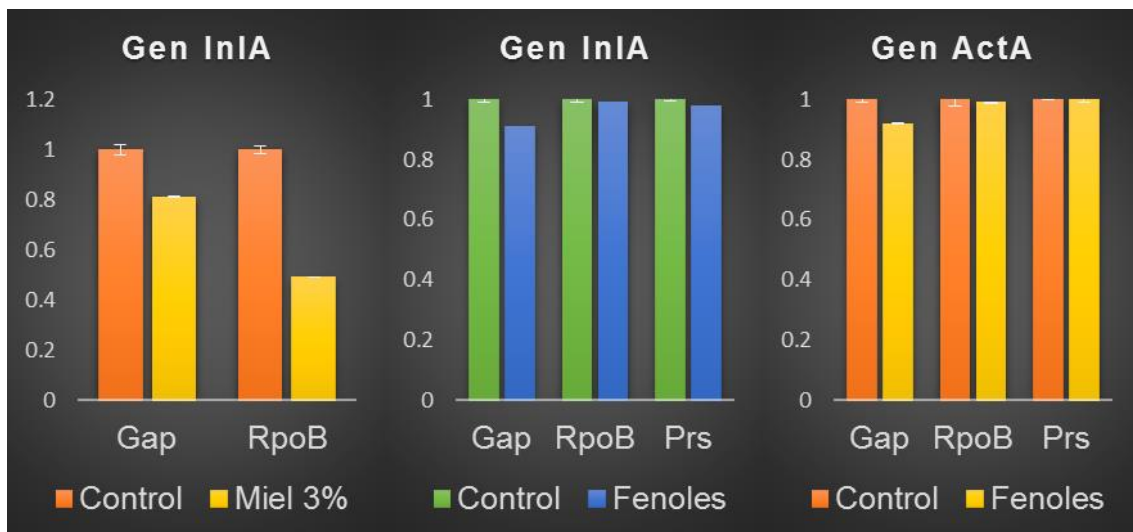


Figura 27. Variación de la expresión génica de los genes de virulencia InIA y ActA de *L. monocytogenes* con 3% de miel de *Melipona beecheii* y con 308  $\mu\text{g}$  de extracto fenólico de miel de *Melipona beecheii*.

## 8. CONCLUSIONES

- Mediante el método de difusión en disco utilizando miel de *Melipona* como agente antimicrobiano se determinó que la miel, el extracto proteico y extracto fenólico inhiben a *Listeria monocytogenes* ATCC15313 a partir de 40% (v/v), 80 µg/mL y 620 µg EAG /mL respectivamente
- Se estableció la Concentración Mínima Inhibitoria la cual fue de 17% de miel, 85 µg/mL de extracto proteico y de 591 µg/mL EAG de extracto fenólico contra *L. monocytogenes* ATCC 15313.
- Se determinó la cinética de muerte en concentración 0.5x y 1x con respecto a la CMI de la miel de *Melipona beecheii* donde se determinó que a las 24 hay una inhibición del 100% con la concentración 1x; mientras que para la concentración 0.5x fue de 99.99% concluyendo que ambas concentraciones ejercen un efecto bactericida contra *Listeria monocytogenes*.
- Se determinó el porcentaje de inhibición a las 24 horas en concentraciones 0.5x, 1x y 2x con respecto a la CMI del extracto fenólico de la miel de *Melipona beecheii* donde se demuestra que en las concentraciones 2x y 1x se tiene un efecto bactericida ya que se presenta una inhibición del 100% de *L. monocytogenes*.



- Se determinó mediante PCR en tiempo real que en una concentración sub letal de miel al 3% de *Melipona beecheii* disminuye la expresión del gen de virulencia InIA lo cual pudiera provocar que la cepa sea menos patógena al disminuir la expresión del gen implicado en la invasión celular del huésped.

## Perspectivas

- Separación e identificación de los compuestos fenólicos presentes en la miel de *Melipona beechei* por medio de HPLC acoplado a masas
- Determinación de la actividad antimicrobiana mediante difusión en disco y concentración mínima inhibitoria por micro diluciones de los diferentes compuestos fenólicos de la miel de *Melipona beecheii* contra *Listeria monocytogenes*
- Determinación de cinética de muerte con los diferentes compuestos de naturaleza fenólica contra *Listeria monocytogenes*
- Determinar cambios en la expresión génica de *Listeria monocytogenes* sobre genes implicados en la virulencia (hly, plcA, inlB, prfA) mediante PCR en tiempo real con dosis sub letales de los compuestos de naturaleza fenólica que tengan actividad antimicrobiana
- Determinar cambios en la expresión génica de *Listeria monocytogenes* sobre genes implicados en la virulencia (hly, plcA, inlB, prfA) mediante PCR en tiempo real con dosis sub letal de miel de *Melipona beecheii*
- Determinación de cinética de muerte con extracto proteico de miel de *Melipona beecheii* contra *Listeria monocytogenes*

- Determinar cambios en la expresión génica de *Listeria monocytogenes* sobre genes implicados en la virulencia (hly, plcA, inlB, prfA) mediante PCR en tiempo real con dosis sub letal de extracto proteico de miel de *Melipona beecheii*

## Referencias

Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., y Le Conte, Y. (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, rsbl20090986.

Alcayaga, S., y Hott, B. (2008). *Listeria* y listeriosis: un desafío de los nuevos tiempos. *Revista Chilena de Salud Pública*, 12(3), p-188.

Bajpai, V. K., Rahman, A., Dung, N. T., Huh, M. K., y Kang, S. C. (2008). In vitro inhibition of food spoilage and foodborne pathogenic bacteria by essential oil and leaf extracts of *Magnolia liliflora* Desr. *Journal of Food Science*, 73(6), M314-M320.

Bastos, E. M., Guzmán, D., Figueroa, J., Tello, J., y Scoaris, D. (2011). Caracterización antimicrobiana y fisicoquímica de propóleos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) de la región andina colombiana. *Acta Biológica Colombia*, 16(1), 175-184.

Benkerroum, N., y Sandine, W. E. (1988). Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, 71(12), 3237-3245.

Bille, J. (1990). Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. *Foodborne listeriosis*. Amsterdam: Elsevier, 71-74.

Bizani, D., Dominguez, A. P. M., y Brandelli, A. (2005). Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. *Letters in Applied Microbiology*, 41(3), 269-273.

Boman HG (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual Review of Immunology*. 13: 61-92.

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.

Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238-250.

Brötz, H., y Sahl, H. G. (2000). New insights into the mechanism of action of lantibiotics—diverse biological effects by binding to the same molecular target. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(1), 1-6.

Brudzynski, K., Abubaker, K., St-Martin, L., y Castle, A. (2011). Re-examining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey.

Bulet, P., Stöcklin, R., y Menin, L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews*, 198(1), 169-184.

Bustin, S.A. 2005a. Real-Time PCR. In: *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics* M.Podda & J.Fuchs, editors. Marcel Dekker. New York, p. 1131-1135.

Camejo, A., Carvalho, F., Reis, O., Leitão, E., Sousa, S., y Cabanes, D. (2011). The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence*, 2(5), 379-394.

Carvajal, J. (2008). Los Aspectos Fisiopatológicos Y Moleculares Involucrados En El Traspaso De *Listeria monocytogenes* A Través De La Barrera Placentaria. (Una Revisión Bibliográfica). *Medicina Al Día*, 20.

Castañeda-Ruelas, G., Eslava-Campos, C., Castro-del Campo, N., León-Félix, J., y Chaidez-Quiroz, C. (2014). Listeriosis in Mexico: Clinical and epidemiological importance. *Salud Pública de México*, 56(6), 654-659.

Chan-Rodríguez, D., Ramón-Sierra, J., Lope-Ayora, J., Sauri-Duch, E., Cuevas-Glory, L., y Ortiz-Vázquez, E. (2012). Antibacterial properties of honey produced by *Melipona beecheii* and *Apis mellifera* against foodborn microorganisms. *Food Science and Biotechnology*, 21(3), 905-909.

Chomczynski, P., y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159.

CODEX, S. (1981). STAN 12-1981. Norma del Codex para la miel. *Codex Alimentarius*. FAO/OMS.

Cushnie, T. T., y Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343-356.

Da Silva, I. A. A., da Silva, T. M. S., Camara, C. A., Queiroz, N., Magnani, M., de Novais, J. S., y de Souza, A. G. (2013). Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chemistry*, 141(4), 352-3558.

Dardón, M. J. (2008). Caracterización fisicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (*Meliponini*) de Guatemala. *Interciencia*, 33(12), 916-922.

Das, K., Tiwari, R., y Shrivastava, D. K. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2), 104-111.

Doganay, M. (2003). Listeriosis: clinical presentation. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35(3), 173-175.

Dramsi, S., Dehoux, P., Lebrun, M., Goossens, P. L., y Cossart, P. (1997). Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infection and Immunity*, 65(5), 1615-1625.

Ennahar, S., y Deschamps, N. (2000). Anti-*Listeria* effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3), 449-457.

Enríquez, Eunice, C. Yurrita, C.H. Aldana, J. Ocheíta, R. Jauregui, P. Chau. (2004). Desarrollo de la crianza de abejas sin aguijón meliponicultura- para el aprovechamiento y comercialización de sus productos, como una alternativa económica sustentable en el área de El Trifinito Chiquimula. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación-MAGA- Guatemala.1-2p.

Epand, R. M., y Vogel, H. J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1462(1), 11-28.

Estevinho, L., Pereira, A. P., Moreira, L., Dias, L. G., y Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3774-3779.

Euán, J. J. G. Q. (2005). Biología y uso de las abejas sin aguijón de la península de Yucatán, México (Hymenoptera, Meliponini) (Vol. 16). UADY.

Ferreres, F., García-Viguera, C., Tomás-Lorente, F., y Tomás-Barberán, F. A. (1993). Hesperetin: A marker of the floral origin of citrus honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61(1), 121-123.

Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. A., Soler, C., García-Viguera, C., Ortiz, A., y Tomás-Lorente, F. (1994). A simple extractive technique for honey flavonoid HPLC analysis. *Apidologie*, 25, 21-21.

Flores, T. G., y Herrera, R. A. R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México*, 47(5), 388-390.

Fonte, L., Díaz, M., Machado, R., Blanco, D., Demedio, J., y García, A. (2013). Physical, chemical and organoleptic characterization of *Melipona beecheii* honey collected in agroforestry systems. *Pastures and Forages*, 36(3), 345-349.

Gedde, M. M., Higgins, D. E., Tilney, L. G., y Portnoy, D. A. (2000). Role of Listeriolysin O in Cell-to-Cell Spread of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 68(2), 999-1003.

Gheldof, N., Wang, X. H., y Engeseth, N. J. (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5870-5877.

Gill, A. O., y Holley, R. A. (2004). Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L.*



*monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. Applied and Environmental Microbiology, 70(10), 5750-5755.

Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., y Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41(4), 1220-1234.

Gould, K. S., y Lister, C. (2005). Flavonoid functions in plants. In Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications (pp. 397-441). CRC Press.

Grajales, J., Rincon, R. M., Vandame, R., Santiesteban, N. A., y Guzmán, M. (2001). Características físicas, químicas y efecto microbiológico de mieles de meliponinos y *Apis mellifera* de la región Soconusco, Chiapas. II Seminario Mexicano sobre abejas sin aguijón, Mérida, Yucatán, México, 61-66.

Gray, M. L., y A. H. Killinger. 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. Bacteriological Review. 30:309-382

Hamon, M., Bierne, H., y Cossart, P. (2006). *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. Nature Reviews Microbiology, 4(6), 423-434.

Hancock, R. E. (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. The Lancet Infectious Diseases, 1(3), 156-164.

Hancock, R. E., y Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nature Biotechnology, 24(12), 1551-1557.

Harborne, J. B. (1989). Methods in plant biochemistry. Volume 1. Plant phenolics. Academic Press Ltd.

Jaganathan, S. K., y Mandal, M. (2009). Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols. *Journal Of Biomedicine and Biotechnology*. Vol. 2009.

Jenkins, R., Burton, N., y Cooper, R. (2011). Manuka honey inhibits cell division in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(11), 2536-2542.

Kazmierczak, M. J., Wiedmann, M., y Boor, K. J. (2006). Contributions of *Listeria monocytogenes*  $\sigma$ B and PrfA to expression of virulence and stress response genes during extra-and intracellular growth. *Microbiology*, 152(6), 1827-1838.

Kemperman, R., Kuipers, A., Karsens, H., Nauta, A., Kuipers, O., y Kok, J. (2003). Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1589-1597.

Kwakman, P. H., te Velde, A. A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C. M., y Zaat, S. A. (2010). How honey kills bacteria. *The FASEB Journal*, 24(7), 2576-2582.

Kwapong, P. K., Ilechie, A. A., y Kusi, R. (2013). Comparative antibacterial activity of stingless bee honey and standard antibiotics against common eye pathogens. *Journal of Microbiology and Biotechnology. Res*, 3(1), 162-168.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2000). *Principios de bioquímica*. Sarvier.

Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., y Clark, D. P. (2008). Brock Biology of Microorganisms 12th edn. International Microbiology, 11, 65-73.

Manyi-Loh, C. E., Clarke, A. M., y Ndip, N. (2011). An overview of honey: therapeutic properties and contribution in nutrition and human health. African Journal of Microbiology Research, 5(8), 844-852.

Marr, A. K., Gooderham, W. J., y Hancock, R. E. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. Current Opinion in Pharmacology, 6(5), 468-472.

Martínez-Guevara, J. L. (2011) Evaluación del perfil y de la actividad antibacteriana de un extracto de flavonoides obtenido de miel de *Melipona beecheii*. Tesis de licenciatura. Mérida, Yucatán, México: Instituto Tecnológico de Mérida.

McPherson, M. J., Hames, B. D., y Taylor, G. R., 2008. PCR a Practical Approach. First Edition edn. Oxford University Press Oxford.

Moll, G. N., Konings, W. N., y Driessen, A. J. (1999). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. In Lactic acid bacteria: Genetics, Metabolism and Applications (pp. 185-198). Springer Netherlands.

Montaño-Pérez, K. (2002). Péptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. Interciencia, 27(1), 21-29.

Muñoz, A. I. (2012). Distribution of *Listeria monocytogenes* serotypes isolated from foods, Colombia, 2000-2009. Biomédica, 32(3), 408-417.

Muñoz, A. I., Vargas, M., Otero, L., Díaz, G., y Guzmán, V. (2011). Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas

de mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá, DC, 2002-2008. *Biomédica*, 31(3), 428-439.

Murray, R. K., Granner, D. K., y Rodwell, V. W. (2007). *Harper bioquímica ilustrada*. M. M. Moreno (Ed.). El Manual Moderno.

Nates-Parra, G. J., M. Rosso, M. Cepeda y J. Lugo. 2009. Características de la Meliponicultura en Colombia. Laboratorio de investigación en abejas (LABUN). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2009). *Lehninger principios de bioquímica*. Omega.

Nightingale, K. K., Windham, K., Martin, K. E., Yeung, M., y Wiedmann, M. (2005). Select *Listeria monocytogenes* subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations in *inlA*, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8764-8772.

Nogueira Neto, P. (1997). *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*.

Paiva, P. M. G., Gomes, F. S., Napoleão, T. H., Sá, R. A., Correia, M. T. S., y Coelho, L. C. B. B. (2010). Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1, 396-406.

Parida, S. K., Domann, E., Rohde, M., Müller, S., Darji, A., Hain, T., y Chakraborty, T. (1998). Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Molecular Microbiology*, 28(1), 81-93.

Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., y Bravo, J. A. (2014). Phenolic Compounds in Food. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81.

Pizarro-Cerdá, J., y Cossart, P. (2006). Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*, 124(4), 715-727.

Posfay-Barbe KM, Wald ER (2009). Listeriosis. *Semin Fetal Neonatal. Medicine*, 14:228-233.

Queiroz-Pimentel, R. B., da Costa, C. A., Albuquerque, P. M., y Junior, S. D. (2013). Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manaosensis* and commercial honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 151.

Ramón-Sierra, J. M., Ruiz-Ruiz, J. C., y 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.

Ramón-Sierra, J. R. (2011). Determinación del perfil proteico y actividad antimicrobiana de un extracto proteico total de la miel de *Melipona beecheii*. Tesis de licenciatura. Mérida, Yucatán, México: Instituto Tecnológico de Mérida.

Reis, O., Sousa, S., Camejo, A., Villiers, V., Gouin, E., Cossart, P., y Cabanes, D. (2010). LapB, a novel *Listeria monocytogenes* LPXTG surface adhesin, required for entry into eukaryotic cells and virulence. *Journal of Infectious Diseases*, 202(4), 551-562.

Rico-Muñoz, E., Bargiota, E. E., y Davidson, P. M. (1987). Effect of selected phenolic compounds on the membrane-bound adenosine triphosphatase of *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology*, 4(3), 239-249.

Rousseaux, S., Olier, M., Lemaitre, J. P., Piveteau, P., y Guzzo, J. (2004). Use of PCR-restriction fragment length polymorphism of *inlA* for rapid screening of *Listeria monocytogenes* strains deficient in the ability to invade Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2180-2185.

Ruiz-Bolívar, Z., Poutou-Piñales, R. A., y Carrascal-Camacho, A. K. (2008). Resistencia antimicrobiana ya desinfectantes de *Listeria spp.* *Nova*, 6(10).

Schmitzova, J., Kludiny, J., Albert, Š., Schröder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., y Šimúth, J. (1998). A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54(9), 1020-1030.

Schuchat, A., Swaminathan, B., y Broome, C. V. (1991). *Listeria monocytogenes* CAMP reaction. *Clinical Microbiology Review*, 4(3), 396.

Schwalbe, R., Steele-Moore, L., y Goodwin, A. C. (Eds.). (2007). *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. Crc Press.

Souza, B., Roubik, D., Barth, O., Heard, T., Enriquez, E., Carvalho, C., y Almeida-Muradian, L. (2006). Composition of stingless bee honey: Setting quality standards. *Interciencia-Caracas*, 31(12), 867.

Temaru, E., Shimura, S., Amano, K., y Karasawa, T. (2007). Antibacterial activity of honey from stingless honeybees (Hymenoptera; Apidae; Meliponinae). *Polish Journal of Microbiology*, 56(4), 281.

Torres, K., Sierra, S., Poutou, R., Carrascal, A., y Mercado, M. (2005). Pathogenesis of *Listeria monocytogenes*, microorganism zoonotic emergent. *Revista MVZ Córdoba*, 10(1), 511-543.

Van Der Veen, S., y Abee, T. (2011). Generation of variants in *Listeria monocytogenes* continuous-flow biofilms is dependent on radical-induced DNA damage and RecA-mediated repair. *PloS One*, 6(12), e28590.

Van Stelten, A., y Nightingale, K. K. (2008). Development and implementation of a multiplex single-nucleotide polymorphism genotyping assay for detection of virulence-attenuating mutations in the *Listeria monocytogenes* virulence-associated gene *inlA*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23), 7365-7375.

Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., y Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 584-640.

Velázquez, L. P. A., Martínez, M. del C. A. y Romero A. C. (2014). Extracción y purificación de ADN. En: *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. Romero, A. C., Díaz, A. S., Aguilar, B. R. y Munice, M. G. R. México. SEMARNAT, INECC, UNAM-I.

Vit, P., Medina, M., y Eunice Enríquez, M. (2004). Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *Bee World*, 85(1), 2-5.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., y Pérez-Álvarez, J. A. (2008). Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science*, 73(9).

Walker, N.J. 2002. Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science* 296: 557-559.

Werbrouck, H., Grijspeerdt, K., Botteldoorn, N., Van Pamel, E., Rijpens, N., Van Damme, J., y Van Coillie, E. (2006). Differential inlA and inlB expression and interaction with human intestinal and liver cells by *Listeria monocytogenes* strains of different origins. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 3862-3871.

Worbs, M., Huber, R., y Wahl, M. C. (2000). Crystal structure of ribosomal protein L4 shows RNA-binding sites for ribosome incorporation and feedback control of the S10 operon. *The EMBO Journal*, 19(5), 807-818.)

Zamora, L. G., y Arias, M. L. (2011). Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón. *Revista Biomédica*, 22(2), 59-66.

Zunabovic, M., Domig, K. J., y Kneifel, W. (2011). Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments—A review. *LWT-Food Science and Technology*, 44(2), 351-362.