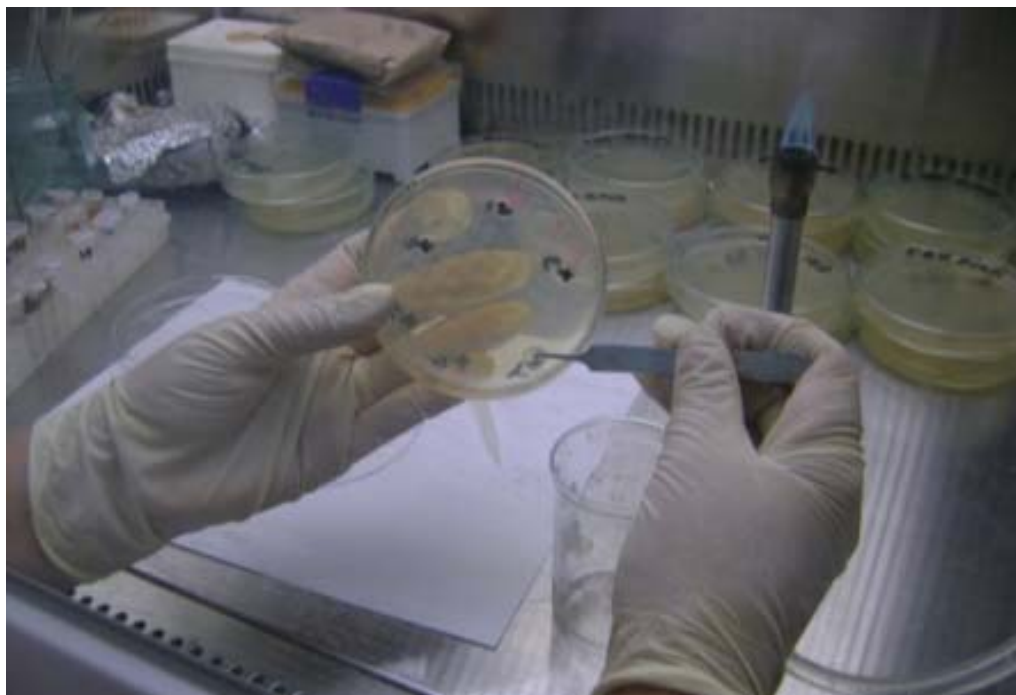




.. **Universidad de Matanzas**  
**“Camilo Cienfuegos”**  

---

**Estación Experimental de Pastos y Forrajes**  
**“Indio Hatuey”**



**Potencialidad antimicrobiana de flores de *Gliricidia sepium*  
y miel de *Melipona beecheii***

**Tesis en opción al título de Master en Pastos y Forrajes**

**Autora: MVZ Leydi Fonte Carballo**  
**Tutores: Dr.C. Maykelis Diaz Solares**  
**Dr.C. Rey Machado Castro**  
**Consultor: Dr.C. Ingrid Aguilar Monge**

**Diciembre, 2012**  
**“Año 54 de la Revolución Cubana”**

**ESTACION EXPERIMENTAL DE PASTOS Y FORRAJES**  
**“INDIO HATUEY”**

**Tesis en opción al título de Maestro en Pastos y Forrajes**

**Potencialidad antimicrobiana de flores de *Gliricidia*  
*sepium* y miel de *Melipona beecheii***

**Aspirante:**

**Dra. MVZ. Leydi Fonte Carballo**

**Tutores:**

**Dra.C. Maykelis Díaz Solares**

**Dr.C. Rey Machado Castro**

**Consultor: Dr.C. Ingrid Aguilar Monge**

**2012**

## **Dedicatoria**

A mi pequeña hija Ainara, quien es la luz de mis ojos y la mayor alegría que puede tener una mujer. Ella fue el motor impulsor que me dio la suficiente fuerza para seguir adelante en las arduas horas de trabajo en el laboratorio. Para que cuando sea mayor y consulte esta tesis se sienta orgullosa de su mamá y entienda el porqué muchas veces no le podía dedicar todo el tiempo que ella demandaba.

A mi abuela Felicia Margarita Ramos Cruz, que desgraciadamente ya no está entre nosotros, pero hubiese estado muy feliz de poder ver a su nieta alcanzar el título de Maestro en Pastos y Forrajes.

*No es porque las cosas sean difíciles que no nos atrevemos, es porque no nos atrevemos, que son difíciles.*

*Sérica*

## Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a mi familia por todo el esfuerzo de conjunto que tuvieron que hacer a lo largo de toda la realización de esta tesis. En especial a mi mamá Teresa Carballo Granado por ser el pilar que sostuvo la casa durante este período para que yo pudiese realizar mis estudios. A mis suegros Idalina Blanco Betancourt, Francisco Blanco Morera y mi cuñada Daimara Blanco Betancourt, por su ayuda incondicional en los cuidados de mi hija. Siempre en ellos encontré el apoyo y la comprensión necesarios. A mi esposo Dairom Blanco Betancourt, quién se mantuvo a mi lado con la mayor paciencia del mundo para ayudarme y darme ánimos. A la Doctora Cacha y su familia por todo el apoyo brindado. A mi hermana Xanadú Tárano León quien me enseñó a no rendirme y siempre seguir adelante.

A mis tutores, la Dr.C. Maykelis Díaz Solares que supo guiar muy bien todos mis pasos en la investigación, adentrándome en el interesante mundo de la Microbiología y la importancia del trabajo en el Laboratorio. Y el Dr.C. Rey Machado Castro, maestro de excepcional experiencia del cual aprendí valiosas lecciones que me servirán en el futuro y que nunca tuvo reparo por abrumado que estuviese de trabajo en prestarme su atención cada vez que necesitaba su ayuda. Al profesor Jorge Demedio Lorenzo quién fue mi primera guía y a quién le agradezco infinitamente todo lo que soy hoy.

A las técnicas Nancy Altunaga, Yohania Sanabria, Yudit Lugo, Niurquis Delfín, Marlene Prieto, Sachari y Yosleidy, de las cuales aprendí a trabajar en el laboratorio y se convirtieron en mi mano derecha durante las arduas horas de lectura de los resultados. A los técnicos Amado y Bebé, como cariñosamente le nombran.

A la doctora Hilda Wencomo por toda la ayuda que me brindó sobre todo en la confección del modelo de tabla utilizado en esta tesis. A el máster Onel López, el M.Sc. Luis Cepero, el Dr.C. Luis Lamela y al Dr.C. Félix Ojeda por sus sabias recomendaciones durante el transcurso de las investigaciones.

Al profesor Ariel García y Deadrik Díaz de los cuales aprendí a realizar las técnicas cromatográficas, de gran importancia para esta tesis.

A Nayda Amengol, Yanirys Ortiz y Evelyn Perdomo por su aporte en la corrección y terminación del documento de tesis

A Yolai Noda y Marlen Navarro quienes sin su ayuda no podrían haberse culminado los análisis estadísticos de la tesis.

A Yasiel por proporcionarnos las cepas de los microorganismos utilizados en el experimento.

A mis compañeros y amigos, Katherine Oropesa, Yoansy García, Wendy Ramirez, Noevis Aróstica, Danys Álvarez, Yuván Contino, Jesús Suárez y Maykelín Fuentes por el gran apoyo brindado.

A todo el personal de servicio de la Estación, en especial a Irma y Odalys

A Claribel por su apoyo y preocupación por la terminación de esta tesis

Al Dr.C Giraldo J. Martín Martín por haber apoyado con medios, recursos e ideas.

Al personal del laboratorio de investigación del Instituto Finlay.

A la Dr.C. Ingrid Aguilar Monge y a sus colegas de trabajo quien siempre me ha apoyado desde la tesis de grado suministrándome información e ideas necesarias para elaborar este documento.

También a la Dr.C. Janet Stewart por los materiales brindados.

En general a todas las personas que de una forma u otras colaboraron con el desarrollo de la investigación

## Resumen

El objetivo de la presente tesis consistió en caracterizar el material biológico de *Gliricidia sepium* y determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de diferentes extractos de la flor y de la miel obtenida a partir del néctar de esta especie producida por *Melipona beecheii*. Para ello se realizó una caracterización morfológica de los árboles de *Gliricidia sepium*, así como la composición bromatológica, la proporción de azúcares en las flores, las características físico-químicas y sensoriales de la miel producida por *Melipona beecheii*. Además, se identificaron los metabolitos secundarios involucrados en la respuesta antimicrobiana de los diferentes extractos de flor y la concentración mínima inhibitoria (CMI). La actividad antimicrobiana de los extractos y la miel se evaluó frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*. Para determinar la existencia de diferencias entre los tratamientos, en función del diámetro del halo de inhibición, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis al no cumplirse los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad, utilizando el software InfoStat versión Libre. Los resultados indicaron que para el método de perforaciones en agar, en tres de los cuatro microorganismos evaluados, la miel en la dilución de 100% fue la que tuvo mayor efecto inhibitorio; siendo *Staphylococcus aureus* la bacteria más susceptible a la miel de este grupo, al mostrar halos de inhibición de 28,0 mm en la dilución al 25%. Sin embargo en el método de disco-placa-cultivo, la miel al 100% fue efectiva únicamente frente a *Candida albicans*, mientras que *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* mostraron susceptibilidad ante el extracto fresco etanólico en esta misma dilución. Se concluye que en los dos métodos evaluados, *S. aureus* fue la bacteria que mostró los mayores halos de inhibición, y fue la más sensible dentro del grupo, tanto a la miel (en el primer método) como al extracto fresco etanólico, y que estos resultados alcanzados confirman el alto valor medicinal que posee la miel de *M. beecheii* por sus efectos terapéuticos. Se recomienda extender los mejores resultados a bioensayos con animales *in vivo* y ampliar el espectro de extractos a probar y en particular los propóleos por sus propiedades antibióticas en animales.

Palabras clave: extractos vegetales, miel, actividad antimicrobiana, *Gliricidia sepium*.

## Índice

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1. Revisión bibliográfica .....	4
1.1 Las plantas medicinales y su utilización en la medicina tradicional.....	4
1.2 ¿Qué es la fitoterapia? .....	4
1.3 Síntesis de metabolitos secundarios en las plantas.....	5
1.4 <i>Gliricidia sepium</i> , una planta forrajera de interés para la medicina natural.....	5
1.4.1 Ubicación taxonómica.....	5
1.4.2 Origen, adaptación y distribución.....	5
1.4.3 Características botánicas.....	6
1.4.4 Usos de la especie.....	7
1.5 Importancia de la miel de <i>Melipona beecheii</i> en la medicina natural.....	9
1.5.1 Usos de las mieles de meliponas.....	9
1.6 Extractos botánicos con fines farmacéuticos.....	10
1.6.1 Materia prima vegetal para la obtención de extractos.....	11
1.6.2 Especificaciones de calidad del extracto vegetal.....	13
1.6.3 Métodos de extracción.....	14
1.6.3.2 Percolación o lixiviación.....	14
1.6.4 Clasificación de los extractos vegetales.....	14
1.6.5 Obtención de extractos.....	14
1.6.6 La separación sólido líquido.....	15
1.6.7 Concentración de extractos.....	16
1.6.8 Secado.....	16
1.7 Enfermedades producidas por enterobacterias.....	16
1.7.1 <i>Escherichia coli</i> .....	16
1.7.1.1 Colibacilosis de los cerdos.....	17
1.7.1.2 Colibacilosis de los becerros.....	18
1.7.1.3 Colibacilosis de los corderos.....	18
1.7.1.4 Colibacilosis de las aves.....	19
1.7.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	19
1.8 Bacterias Gram positivas.....	19
1.8.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	19

1.9 Enfermedades micóticas. ....	20
1.9.1 <i>Candida albicans</i> . ....	20
CAPÍTULO 2. Materiales y Métodos. ....	22
2.1 Caracterización del área de estudio. ....	22
2.1.2 Localización. ....	22
2.1.2 Clima. ....	22
2.1.3 Suelo. ....	22
2.2 Caracterización del material biológico (flores de <i>Gliricidia sepium</i> y miel de la abeja <i>Melipona beecheii</i> ). ....	23
2.2.1 Recogida de material vegetal en campo. ....	23
2.2.2. Metodologías empleadas para la caracterización botánica de <i>Gliricidia sepium</i> . ...	24
2.2.3 Determinación de la composición bromatológica de las flores de <i>G. sepium</i> . ....	24
2.2.3.1. Determinación de la humedad en la muestra. ....	24
2.2.3.2. Determinación de hidrólisis ácida analítica (HAA) y lignina de Klason. ....	25
2.2.4 Metodología empleada para la caracterización de la miel de <i>Melipona beecheii</i> . ...	26
2.2.4.1 Estudio palinológico. ....	26
2.2.4.2 Determinación cromatográfica de los azúcares presentes en el macerado de flores de <i>G. sepium</i> y la miel de <i>M. beecheii</i> mediante la Cromatografía Líquida de Eficiencia Elevada (HPLC). ....	27
2.3 Preparación de los extractos vegetales. ....	27
2.4 Cromatografía en Capa Delgada. ....	27
2.4.1 Detección de flavonoides según la metodología de Wagner <i>et al.</i> (1984). ....	28
2.4.2 Detección de antraquinonas según la metodología de Wagner & Bladt (2001). ....	28
2.4.3 Detección de alcaloides según la metodología de Wagner <i>et al.</i> (1984). ....	29
2.4.4 Detección de saponinas según la metodología descrita por Wagner & Bladt (2001). ....	29
2.4.5 Detección de terpenos, taninos condensados, flavonoides y saponinas según la metodología de Cannell (1998). ....	30
2.5 Estudios microbiológicos. ....	30
2.5.1 Cepas de microorganismos. ....	30
2.5.2 Medios de cultivo. ....	30
2.5.3 Controles. ....	30
2.5.4 Ensayo de microdilución. ....	30

2.5.4.1 Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos.....	30
2.5.4.2 Preparación de los extractos y controles.....	31
2.5.4.3 Preparación de los inóculos. ....	31
2.5.4.4 Descripción de la técnica de microdilución de placa. ....	31
2.5.5 Ensayo de la actividad antimicrobiana.....	31
2.5.5.1 Método de perforaciones en agar.....	32
2.5.5.2 Método de disco-placa-cultivo. ....	32
2.5.5.3 Incubación, crecimiento microbiano y efecto inhibitorio. ....	32
2.6 Procesamiento estadístico.....	32
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	33
3.1 Caracterización morfológica de los árboles de <i>Gliricidia sepium</i> .....	33
3.1.1 Composición bromatológica y determinación de la proporción de azúcares en las flores de <i>Gliricidia sepium</i> (proveniente del néctar). ....	35
3.1.2 Caracterización físico-química y organoléptica de la miel de <i>Melipona beecheii</i> . ..	37
3.1.2.1 Estudio Palinológico. ....	40
3.2 Identificación cualitativa por Cromatografía en Capa Delgada (CCD) de algunos metabolitos secundarios.....	42
3.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los diferentes extractos de flor de <i>Gliricidia sepium</i> y de miel de <i>Melipona beecheii</i> .....	48
3.4 Efecto de los extractos de flor de <i>Gliricidia sepium</i> y miel de <i>Melipona beecheii</i> sobre la inhibición del crecimiento microbiano.....	51
3.4.1 Actividad antimicrobiana frente a <i>Escherichia coli</i> .....	51
3.4.2 Actividad antimicrobiana frente a <i>Candida albicans</i> . ....	54
3.4.3 Actividad antimicrobiana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .....	55
3.4.4 Actividad antimicrobiana frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	59
3.4.5 Síntesis de la actividad antimicrobiana frente a los cuatro microorganismos evaluados.....	61
CONCLUSIONES .....	63
RECOMENDACIONES.....	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65
ANEXOS.....	79

## Índice de tablas

Tabla 1.1 Época óptima de cosecha de los diferentes órganos vegetales. ....	12
Tabla 2.1. Indicadores climatológicos durante el período de evaluación. ....	23
Tabla 3.1. Indicadores cuantitativos de la caracterización botánica. ....	33
Tabla 3.2. Composición bromatológica de flores de <i>Gliricidia sepium</i> . ....	36
Tabla 3.3. Contenido de glucosa, fructosa y sacarosa presentes en el extracto acuoso de flor de <i>Gliricidia sepium</i> a temperatura ambiente. ....	36
Tabla 3.4. Características físico-químicas y organolépticas de miel de <i>Melipona beecheii</i> . ....	38
Tabla 3.5. Propuesta de Norma de Calidad para mieles de melipónidos (Vit, 2000). ....	38
Tabla 3.6. Contenido de glucosa, fructosa y sacarosa presentes en la miel de <i>Melipona beecheii</i> obtenida de la colmena 4. ....	40
Tabla 3.7. Resumen del análisis palinológico en muestras de polen y miel de la colmena 4. ....	41
Tabla 3.8. Resultado de la CCD realizada a los extractos metanólicos y etanólicos de flores frescas y secas de <i>Gliricidia sepium</i> . ....	42
Tabla 3.9. Concentración Mínima inhibitoria (CMI) de extractos de flores de <i>Gliricidia sepium</i> y miel de <i>Melipona beecheii</i> . ....	49
Tabla 3.10. Actividad antimicrobiana de los extractos de flor de <i>Gliricidia sepium</i> y la miel de <i>Melipona beecheii</i> frente a <i>Escherichia coli</i> . ....	53
Tabla 3.11. Actividad antimicrobiana de los extractos de flor de <i>Gliricidia sepium</i> y la miel de <i>Melipona beecheii</i> frente a <i>Candida albicans</i> . ....	56
Tabla 3.12. Actividad antimicrobiana de los extractos de flor de <i>Gliricidia sepium</i> y la miel de <i>Melipona beecheii</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	58
Tabla 3.13. Actividad antimicrobiana de los extractos de flor de <i>Gliricidia sepium</i> y la miel de <i>Melipona beecheii</i> frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> . ....	60
Tabla 3.14. Resumen de los tratamientos que mostraron mejores resultados de actividad antimicrobiana por microorganismo. ....	61

## Índice de figuras

Figura 1.1 Proceso de obtención de extractos a partir de plantas medicinales .....	12
Figura 3.1. Cromatograma por HPLC de la sacarosa, la glucosa y la fructosa del extracto acuoso de flor de <i>Gliricidia sepium</i> . ....	37
Figura 3.2. Cromatograma por HPLC de la sacarosa, la glucosa y la fructosa de la miel de <i>Melipona beecheii</i> . ....	40
Figura 3.3. Cromatografía en Capa Delgada para detectar metabolitos secundarios (longitud de onda de 254nm). FM: extracto fresco metanólico, SM: extracto seco metanólico, FE: extracto fresco etanólico y SE: extracto seco etanólico.....	43
Figura 3.4. Cromatografía en Capa Delgada para detectar flavonoides. A: longitud de onda de 254nm, B: 366nm (NP/PEG). FM: extracto fresco metanólico, SM: extracto seco metanólico, FE: extracto fresco etanólico y SE: extracto seco etanólico. ....	45
Figura.3.5. Cromatografía en Capa Delgada para detectar antraquinonas. A: a una longitud de onda de 254nm, B: mediante vapores de iodo. FM: extracto fresco metanólico, SM: extracto seco metanólico, FE: extracto fresco etanólico y SE: extracto seco etanólico.....	46
Figura.3.6 Cromatografía en Capa Delgada para detectar saponinas. A: a una longitud de onda de 254nm B: mediante la solución Vanilina- Ácido Sulfúrico (como detector) FM: extracto fresco metanólico, SM: extracto seco metanólico, FE: extracto fresco etanólico y SE: extracto seco etanólico. ....	47
Figura. 3.7. Cromatografía en Capa Delgada para detectar alcaloides utilizando la solución de Dragendorff como detector. FM: extracto fresco metanólico, SM: extracto seco metanólico, FE: extracto fresco etanólico y SE: extracto seco etanólico.....	48

## Índice de anexos

Anexo 1. Concentración mínima inhibitoria del extracto seco etanólico frente a la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	79
Anexo 2. Concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico (fresco y seco) de flores de <i>G.sepium</i> de <i>Meliponabeecheii</i> frente a la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	80
Anexo 3. Concentración mínima inhibitoria del extracto metanólico (fresco y seco) de flores de <i>G.sepium</i> de <i>Meliponabeecheii</i> frente a la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i> .	81
Anexo 4. Concentración mínima inhibitoria de la miel de <i>Melipona beecheii</i> frente a la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	82
Anexo 5. Actividad antimicrobiana de la miel de <i>Melipona beecheii</i> frente a la bacteria <i>Escherichia coli</i> utilizando el método de perforaciones en agar.....	83
Anexo 7. Actividad antimicrobiana de la miel de <i>Melipona beecheii</i> frente a la bacteria <i>Candida albicans</i> utilizando el método de perforaciones en agar. ....	84
Anexo 8. Actividad antimicrobiana de la miel de <i>Melipona beecheii</i> frente a la bacteria <i>Candida albicans</i> utilizando el método de disco-placa-cultivo. ....	84
Anexo 9. Actividad antimicrobiana de la miel de <i>Melipona beecheii</i> frente a la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando el método de perforaciones en agar. ....	85
Anexo 10. Actividad antimicrobiana del extracto fresco etanólico de flor de <i>G. sepium</i> frente a la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando el método de disco-placa-cultivo. ...	85
Anexo 11. Actividad antimicrobiana de la miel de <i>Melipona beecheii</i> frente a la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i> utilizando el método de perforaciones en agar.....	86
Anexo 12. Actividad antimicrobiana del extracto seco metanólico de flor de <i>G. sepium</i> frente a la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i> utilizando el método de disco-placa-cultivo. ....	86

## Abreviaturas

### Abreviaturas

fig: figura

g: gramo

ha: hectárea

kg: kilogramo

mg: milígramo

μL: microlitro

mL: mililitro

IU: unidades internacionales

mmeq: milímetros equivalentes

nm: nanómetros

mm: milímetros

m: metro

cm: centímetro

°C: grado Celsius

min: minutos

M V. s: mili voltios por segundo

%: por ciento

MS: materia seca

PB: proteína bruta

FB: fibra bruta

LK: lignina de Klason

Ca: calcio

HPLC: Cromatografía Líquida de Eficiencia Elevada

CCD: Cromatografía en Capa Delgada

msnm: metros sobre el nivel del mar

DAP: diámetro a la altura del pecho

FM: extracto fresco metanólico

SM: extracto seco metanólico

FE: extracto fresco etanólico

SE: extracto seco etanólico

EF: extracto fresco

ES: extracto seco

EI (%): porcentaje del efecto inhibitorio respecto al control positivo

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

## INTRODUCCIÓN

La utilización de leguminosas arbustivas es una herramienta para aumentar la calidad y productividad de las pasturas con el propósito de mejorar la producción animal. Dentro de ellas, *Gliricidia sepium* tiene atributos que destacan su versatilidad como son: la producción de follaje de alta calidad y digestibilidad, que al asociarse con gramíneas aumentan la producción de materia seca de los pastos asociados, logrando mayor capacidad de carga. También mejora la fertilidad del suelo, a través de la fijación del nitrógeno atmosférico y utilizada como abono verde, así como producción de madera y leña y el suministro de sombra para cultivos y animales (Pezo *et al.*, 1993; Chacón, 1996).

Aunque esta especie está catalogada como un árbol multipropósito por las utilidades que presenta de acuerdo con su fenotipo, su composición química y las condiciones edafoclimáticas bajo las cuales se desarrolla, también posee propiedades medicinales, ya que existen investigaciones de extractos de *Gliricidia sepium* donde se evalúa su capacidad inhibitoria en el desarrollo microbiano y para combatir al *Tripanosoma cruzi* (Berger *et al.*, 1998). Además se han realizado investigaciones para comprobar la actividad antifúngica (Caceres *et al.*, 1993), cuyos resultados fueron positivos.

Los resultados de las investigaciones descritas anteriormente parten de la base de que según Sabovljevic (2006), las plantas, por su biodiversidad y riqueza en metabolitos secundarios, proporcionan una interesante fuente de posibles sustancias activas contra muchas bacterias. Por ello, en los últimos años se ha desarrollado un creciente interés en varios centros de investigación de todo el mundo en la búsqueda de efectos antibacterianos de extractos de múltiples especies vegetales.

Por otra parte, *G. sepium*, es un árbol melífero del cual se obtiene una miel de excelente calidad, que según Enríquez y Aguilera (2008), presenta actividad antimicrobiana, lo que la convierte en una terapia alternativa frente a la presencia de bacterias patógenas que causan enfermedades infecciosas tanto a los animales como al hombre y que son resistentes a los antibióticos. Algunos investigadores reportan que la actividad antibacteriana de la miel es debido a su efecto osmótico por su alto contenido de azúcares. Sin embargo, diversos estudios microbiológicos indican que la miel tiene otros componentes antibacterianos más efectivos tales como los flavonoides que son metabolitos secundarios que provienen de las plantas que polinizan las abejas (Molan, 2001).

A pesar de todas las bondades que brinda *G.sepium* a través de sus disímiles usos y propiedades se identificó el siguiente problema científico:

En la actualidad se desconoce la actividad antimicrobiana de las flores de *Gliricidia sepium* y de la miel obtenida por *Melipona beecheii* a partir del néctar extraído de las flores de esta especie. De ahí que se plantee la siguiente hipótesis:

**Hipótesis:** Los extractos de la flor de *Gliricidia sepium* y la miel producida por *Melipona beecheii*, presentan actividad antimicrobiana frente a patógenos de origen bacteriano y fungoso.

**Objetivo general:**

- Caracterizar el material biológico de *Gliricidia sepium* y determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de diferentes extractos de la flor y de la miel obtenida a partir del néctar de esta especie producida por *Melipona beecheii*.

**Objetivos específicos:**

1. Determinar las características morfológicas de los árboles de *Gliricidia sepium*, así como la composición bromatológica, la proporción de azúcares en las flores y las características físico-químicas y sensoriales de la miel producida por *Melipona beecheii*.
2. Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios involucrados en la respuesta antimicrobiana de los diferentes extractos de la flor.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos obtenidos.
4. Demostrar el efecto de los extractos sobre la inhibición del crecimiento microbiano.

**Novedad Científica**

Por vez primera en Cuba:

1. Se demuestra la potencialidad de la actividad antimicrobiana de flores de *Gliricidia sepium* y de la miel de *Melipona beecheii* en la eliminación microorganismos que inciden en el desarrollo de enfermedades que impactan a diversas categorías animales de interés.
2. Se evalúa la actividad antimicrobiana de flores de *Gliricidia sepium* y de la miel de *Melipona beecheii* mediante dos métodos diferentes no excluyentes.

3. Se brindan los primeros resultados en la determinación del contenido azúcares en el extracto fresco de la flor de *Gliricidia sepium* y en la miel de *Melipona beecheii* mediante técnicas cromatográficas.
4. Se contribuye al conocimiento *sui generis* de la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de flores de *Gliricidia sepium*.

## **CAPÍTULO 1. Revisión bibliográfica**

### **1.1 Las plantas medicinales y su utilización en la medicina tradicional.**

El uso de las plantas con fines terapéuticos en la medicina tradicional es un importante legado que han dejado generaciones anteriores y una parte de la cultura de los pueblos. Existen innumerables sustancias químicas vegetales que pueden considerarse fármacos y son empleados en uno o más países, de las cuales el 74% fue descubierto a partir de su empleo en medicina tradicional (Rojas *et al.*, 2004).

Se considera producto natural a toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, se presente en forma farmacéutica, y se identifique como tal por su actividad farmacológica, características físicas, químicas y biológicas (Ruíz, 1984).

La etnobotánica trata del conocimiento botánico de las plantas por parte de las comunidades indígenas y comprende una estrecha relación entre las plantas y las personas que la utilizan. Como planta medicinal se conoce a cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la síntesis químico-farmacéutica. En la actualidad las plantas medicinales deben ostentar las consideraciones legales para la elaboración de los medicamentos (Laboratorio de Farmacodinamia y Fitofarmacología, 2002).

### **1.2 ¿Qué es la fitoterapia?**

Según el Laboratorio de Farmacodinamia y Fitofarmacología (2002), la Fitoterapia es la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico. El retroceso hacia el uso de los productos de origen natural en terapéutica, además del “retorno a la naturaleza” que se ha producido de forma general en la sociedad, como respuesta al daño ecológico y cultural que ha provocado el industrialismo, se ha visto favorecido por:

- Numerosas evidencias de los graves efectos secundarios en fármacos de síntesis.
- El avance químico, farmacológico y clínico del conocimiento en torno a los fitofármacos.
- El desarrollo de nuevas formas de preparación y administración de los fitofármacos.
- El desarrollo de métodos y técnicas que garantizan un mejor control de calidad.

### **1.3 Síntesis de metabolitos secundarios en las plantas.**

Las plantas presentan dentro de su proceso de síntesis dos rutas metabólicas, una donde sintetizan los metabolitos primarios que son los necesarios para el desarrollo de la propia planta como son: proteínas, lípidos, carbohidratos y algunos micro nutrientes, es decir, de presencia universal en todas las especies vegetales. En la segunda ruta metabólica producen en específico un metabolito secundario que en función de su genética lo sintetiza específicamente en mayor proporción que los demás componentes. Entre estos metabolitos secundarios son comunes aquellos que presentan alguna actividad biológica, tales como: aminoácidos no proteicos, esteroides, fenoles, flavonoides, glucósidos, glucosinolatos, quinonas, taninos, alcaloides y terpenoides. Existe gran variación en cuanto a la concentración de metabolitos secundarios en las diferentes partes de las plantas, no teniendo un patrón de máxima producción, ni órganos especiales de almacenaje. Sin embargo, lo común es que las mayores concentraciones de este tipo de compuestos se encuentren en flores y semillas (Arguayo, 2002).

### **1.4 *Gliricidia sepium*, una planta forrajera de interés para la medicina natural**

#### **1.4.1 Ubicación taxonómica.**

*Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. (1842) pertenece al género *Gliricidia*, subfamilia Faboideae, familia Leguminosae o Fabaceae, orden Fabales (Sablón, 1985). En el género se incluyen otras dos especies: *G. maculata* y *G. guatemalensis*, que se diferencian de *G. sepium* en algunas características morfológicas relacionadas con las legumbres, las hojas, las flores y el porte de la planta (CATIE, 1991). En Cuba, *Gliricidia* es un género monotípico, ya que se encuentra solo *G. sepium* (Barreto, 1990).

Generalmente *G. sepium* se conoce en Cuba como: bienvestido, piñón florido, piñón cubano, piñón amoroso, piñón violento y júpiter; matarratón en Colombia; madero negro en Costa Rica; y otros nombres vulgares de acuerdo con el país. En inglés se denomina cocoa, en francés lilas étranger y en portugués mae do cacau (Pérez Domínguez, 1989). Sus sinónimos son *Robinia sepium* (Jacq.) y *Lonchocarpus sepium* DC.

#### **1.4.2 Origen, adaptación y distribución.**

*Gliricidia sepium* es nativa de las zonas bajas de México hasta Colombia y Venezuela (Sablón, 1985). Se ha difundido en las áreas tropicales de América, África, Asia y Australia, naturalizándose en lugares húmedos y secos (CATIE, 1991).

De forma natural se puede desarrollar en áreas con precipitaciones de 2 300 mm/año; mientras que fuera de este entorno ha sido plantada en climas con precipitaciones entre 785 y 3 500 mm/año; puede sobrevivir en zonas semiáridas de hasta 400 mm/año, pero bajo estas condiciones su crecimiento es lento (Pérez-Domínguez, 1989).

Tolera una gama amplia de suelos, desde arenas puras hasta vertisoles negros profundos, con un pH de 4 a 7. Se ha observado poca supervivencia en terrenos de mal drenaje interno y en suelos extremadamente ácidos y con alto contenido de aluminio. Además presenta un desarrollo adecuado a temperaturas entre 20,7 y 29,2 °C, pero probablemente reduzca su crecimiento y se defolie si estas son inferiores a 15 °C (Simons, 1996). Es una planta heliófila, que se afecta cuando existen otras plantas que compiten con ella por la luz.

Según Sardiñas (2009) en el caso de Cuba, esta especie se encuentra naturalizada en toda su geografía; no obstante, su uso fundamentalmente se ha limitado a postes para cercas de áreas ganaderas, como sombra de cafetales; siendo muy limitado, casi nulo, su empleo en sistemas silvopastoriles, donde ha predominado la inclusión de *Leucaena leucocephala* como árbol predominante. Igualmente no se aprovechan las bondades de esta especie en la producción y empleo de abonos verdes, cuestión en la que se debe trabajar para cambiar la conducta actual.

#### **1.4.3 Características botánicas.**

*G. sepium* es un árbol de porte pequeño a mediano, que puede alcanzar de 10 a 15 m de altura y entre 40 y 70 cm de diámetro basal, dependiendo del ecotipo. Su copa es ancha y con ramificación simpódica bípara; presenta raíz pivotante (Alvarez y Varona, 1988). La madera tiene arbura y duramen bien definidos, un alto valor calorífico (Otárola, 1995) y es resistente a las termitas y la pudrición.

Las hojas están compuestas, imparipinnadas y deciduas, con folíolos aovados a oblongos (Sablón, 1985). Las flores son rosadas, hermafroditas, en racimos densos, axilares, y se presentan de diciembre a marzo papilionadas que se disponen en racimos cortos que se curvan hacia arriba, de hasta 15 cm de largo, con 30-100 flores cada una. Cada flor mide unos 2 cm y son rosadas o lila (Barrance *et al.*, 2003).

Los frutos son legumbres leñosas que contienen semillas planas y elípticas (Fors, 1965). Miden de 10-17 cm de longitud, las inmaduras de color verde rojizo, marrón amarillento al

madurar. Cada legumbre contiene 3-10 semillas en forma de lenteja de 8-12 mm, marrones amarillentas o anaranjadas.

*G. sepium* contiene de 7 000 a 9 000 semillas/kg; su germinación varía desde 80 a 90 % (Pérez-Domínguez, 1989) hasta más del 90 % en semillas recién cosechadas (Cobbina *et al.*, 1990).

Este árbol es autoincompatible; su fecundación se realiza con el polen de otros individuos, generalmente nunca del mismo árbol (Simons, 1996), y aunque florece en todo el país no siempre produce legumbres y en otros casos éstas no forman semillas (Pérez *et al.*, 1996). A pesar de ello, se considera que las semillas formadas son de alta calidad y fertilidad; en una comparación entre dos sistemas de propagación (estaca vs semilla) se perdió solo el 10 % de las plantas por semilla y el 40 % por estaca (Pérez, 1995).

La semilla de piñón florido es permeable, contrariamente a lo que ocurre en la mayoría de las leguminosas forrajeras, por lo que antes de sembrarla no es necesario la inmersión en agua caliente (Anon, 1994). Por esta razón se requiere el uso de la semilla fresca o preservada al frío (Glover, 1989), aunque después de recolectada y a los 12 meses de almacenada al ambiente, esta declina hasta 18 % su poder germinativo (Cobbina *et al.*, 1990).

Con el objetivo de aumentar la calidad de la semilla y su producción se han realizado ensayos a nivel de vivero y plantación, en los cuales se determinó el resultado más sobresaliente en cuanto a rendimiento y calidad de la biomasa total, mejor fuente semillera y resistencia a la defoliación del insecto *Azeta versicolor* (CATIE, 1991).

#### **1.4.4 Usos de la especie.**

Está catalogado como un árbol multipropósito por las utilidades que presenta, de acuerdo con su fenotipo, su composición química y las condiciones edafoclimáticas bajo las cuales se desarrolla. Usualmente las plantas de *Gliricidia sepium* se utilizan como sombra transitoria, permanente y soporte vivo (Ronald, 1988) y en el control de malas hierbas en cacao, café y té (Seibert, 1988). El extracto de sus hojas tiene efectos alelopáticos, por lo que influye en la germinación y el crecimiento de algunas plantas (Rodríguez *et al.*, 1994).

Sus flores son comestibles para el hombre (Roig, 1974) y tienen gran utilidad como melíferas y en ornamentación (Glover, 1989); mientras que las semillas y la corteza pulverizadas y mezcladas con arroz tienen cualidades rodenticidas (Roig, 1974). La especie

se encuentra entre las mejores y más conocidas leguminosas forrajeras arbóreas, aunque los altos consumos producen toxicidad en algunos monogástricos; en los rumiantes puede constituir una fuente proteica sobre todo en la época de sequía (Simón, 1996).

Dentro de las técnicas agroforestales su empleo como cerca viva ocupa un lugar destacado, ya que implica un menor costo de establecimiento y mayores ingresos en relación con otros tipos de cerca (Suárez *et al.*, 1996), además de posibilitar la adquisición de leña, postes vivos y forraje (Pérez, 1995).

Sin embargo la mayoría de las investigaciones químicas previas en *G. sepium* se han dirigido al aislamiento del potencial alelopático y componentes tóxicos del corazón del tronco. Estas investigaciones han obtenido el aislamiento de flavonas, isoflavonas y pterocarpanos (Jurd y Manner, 1977; Manner y Jurd, 1979 y Herat *et al.*, 1998).

En la medicina tradicional los extractos de esta planta son usados para reducir la fiebre en niños y adultos, empleados en el tratamiento de infecciones producidas por diversos microorganismos *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Neisseria gonorrhoeae* (Gupta, 1995).

Existen algunas investigaciones de extractos de *Gliricidia sepium* donde se evalúa capacidad inhibitoria en el desarrollo microbiano y para combatir al *Tripanosoma cruzi* (Berger *et al.*, 1998). También se han realizado investigaciones para comprobar la actividad antifúngica (Caceres *et al.*, 1991).

Es aceptada como abono verde, empleándose en plantaciones de arroz (*Oriza sativa*) (Kang y Mulongoy, 1987), en asociación con Nacedero (Pérez, 1995) y otros cultivos. Se ha utilizado en zonas alomadas de Cuba y en terrazas de Colombia, para minimizar con ello las pérdidas de suelo y agua (Vega *et al.*, 1987).

La descomposición de las partes de la planta desempeña un papel importante en el mejoramiento de la materia orgánica y de los nutrimentos; esta puede ser afectada por el incremento de la edad y la disminución de la humedad del sitio. Se han obtenido resultados más efectivos al incorporar el material vegetativo a los 3 ó 5 meses de edad y en suelos con un contenido de 15 a 20 % de humedad al final de la época de lluvia (CATIE, 1991).

## **1.5 Importancia de la miel de *Melipona beecheii* en la medicina natural.**

En México, la especie *Melipona beecheii*, llamada entre los apicultores simplemente melipona, produce en promedio un litro de miel al año, y su constitución físico-química es muy distinta a la de la abeja melífera. No es usada como edulcorante, es más líquida, pues contiene 26 % o más de humedad y su sabor es más ácido. Su aplicación es netamente medicinal. Como estas abejas sin aguijón usan un tipo diferente de estructura para almacenar la miel y para el nido de cría, los mejores métodos de mantener estas abejas no son muy eficaces en aumentar la producción. Esto, en combinación con bajos rendimientos, hace que el cuidado de estas abejas sea económicamente práctico sólo para uso casero (Labougle y Zozaya, 1986).

Respecto a la miel de meliponas, Grajales *et al.* (2001), indica que las civilizaciones aborígenes mexicanas la utilizaron con fines comerciales, rituales y medicinales, pero que hasta nuestros días, son pocos los estudios con base científica que se han realizado. Estos autores determinaron para las muestras de *Melipona beecheii* (dos muestras), pH (4,5), acidez (28 meq/kg), humedad (24 %), conductividad eléctrica (0,551 mS/cm), y HMF (64,79 mg/kg). A falta de una norma para las mieles de melipónidos, los propios autores toman como referencia los parámetros establecidos para la miel de *Apis mellifera*.

La miel de las abejas sin aguijón, además de sus importantes características alimenticias, es ampliamente utilizada en medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades (oculares conjuntivitis, pterigios y cataratas), respiratorias y digestivas, lo cual la hace un producto muy apreciado localmente y de gran demanda en tiendas y farmacias naturistas. Por diversas razones relacionadas con su escasez, sus características medicinales y otras propiedades, la miel de melipónidos alcanza precios varias veces más altos que el de la de *Apis mellifera* en los mercados locales, lo cual las hace una interesante alternativa de ingresos complementarios para las familias rurales. Lamentablemente, en muchos casos la obtención de este producto la realizan cazadores de miel, quienes al momento de extraerla destruyen la colonia (y el árbol en el que se encuentra) o la dejan en muy malas condiciones, haciéndola vulnerable al ataque de parásitos y predadores (Rosso y Nates, 2005).

### **1.5.1 Usos de las mieles de meliponas.**

En Costa Rica la miel posee disímiles aplicaciones entre ellas:

- Sirve para aliviar dolores después del parto.

- Prevenir hemorragias vaginales y várices, pues se plantea que purifica la sangre y limpia los órganos reproductivos y digestivos.
- Como tónico vitalizante.
- En la prevención y el tratamiento de afecciones del tracto respiratorio.

Se consume con tortilla o pan con "cuajada" o se usa para endulzar jugos de fruta (Ramírez y Ortiz, 1995).

Mientras que en México, Ut'anYik'elkab, 1991; Ramírez y Ortiz, 1995 reportan que se utiliza por ejemplo:

- Para tratar afecciones como úlceras en la boca, erupciones en la piel y problemas urinarios.
- En el restablecimiento de las mujeres que acaban de dar a luz ó curación del Sudor de Noche.
- También en el tratamiento de la catarata en los ojos y para aliviar golpes en los ojos de los animales.
- La cera se utiliza para la confección de candelas, también como sustituto de la grasa o margarina. Los recipientes para guardar alimentos se sellaban con cera de abejas. En las marimbas es usada para afinar las teclas o pegar los diafragmas en los tubos de resonancia.

Además según Solís, 2000, la miel en Guatemala se emplea con los siguientes fines:

- Comestible: la miel y el suchío (polen)
- Medicinales: la miel. Sirve para tratamiento de las "nubes" en la vista, curar llagas, eliminar cicatrices, fortalecer pulmones, en quemaduras, dolores musculares y para que crezcan las uñas.
- Doméstico: la cera. Sirve para sacar espinas, para cubrir las baquetas de la marimba, para los machetes, dolor de oídos, para tapar ollas y tambos, para pegar cosas en la pared.

#### **1.6 Extractos botánicos con fines farmacéuticos.**

Según la Pharmacopea (2007), los extractos de plantas medicinales se utilizan por el hombre desde la antigüedad para la cura de múltiples dolencias. Se obtienen mediante la

separación de porciones biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, con el uso de un solvente (alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo) y un proceso de extracción adecuado.

Para la industria farmacéutica las plantas medicinales son una fuente de nuevas moléculas con efectos farmacológicos, que son utilizables directamente y que permiten obtener productos farmacéuticos con menores efectos secundarios y satisfacer las necesidades crecientes del uso de productos naturales (Polanco, 2003). La Figura 1.1 muestra algunas de las etapas generales para la obtención de extractos vegetales.

#### **1.6.1 Materia prima vegetal para la obtención de extractos.**

Según Chife (2005), uno de los aspectos más importantes en la producción de extractos medicinales es garantizar altos rendimientos del material vegetal y elevado contenido de principios activos, lo que depende, entre otros aspectos, de:

- Elección adecuada del material vegetal (por su empleo tradicional o validación científica de su uso).
- Factores pre cosecha: disponibilidad de la especie, factibilidad del cultivo, lugar y época de cultivo e identificación botánica.
- Factores post cosecha: selección, secado, molinado y almacenaje.

Este mismo autor refiere que las condiciones de cosecha y procesamiento influyen en la cantidad final de metabolitos recuperables del tejido de las plantas. Se debe conocer la parte de la planta a cosechar, la época y la forma de corte como se describe en la tabla 1.1, debido a que del manejo post cosecha dependerá en gran medida que el material mantenga y conserve las características físicas, químicas, organolépticas y farmacológicas. El material fresco debe ser inmediatamente bien manipulado de forma que no se deteriore, desechando partes manchadas o enfermas de la planta, así como realizar el lavado con agua corriente de ser necesario.

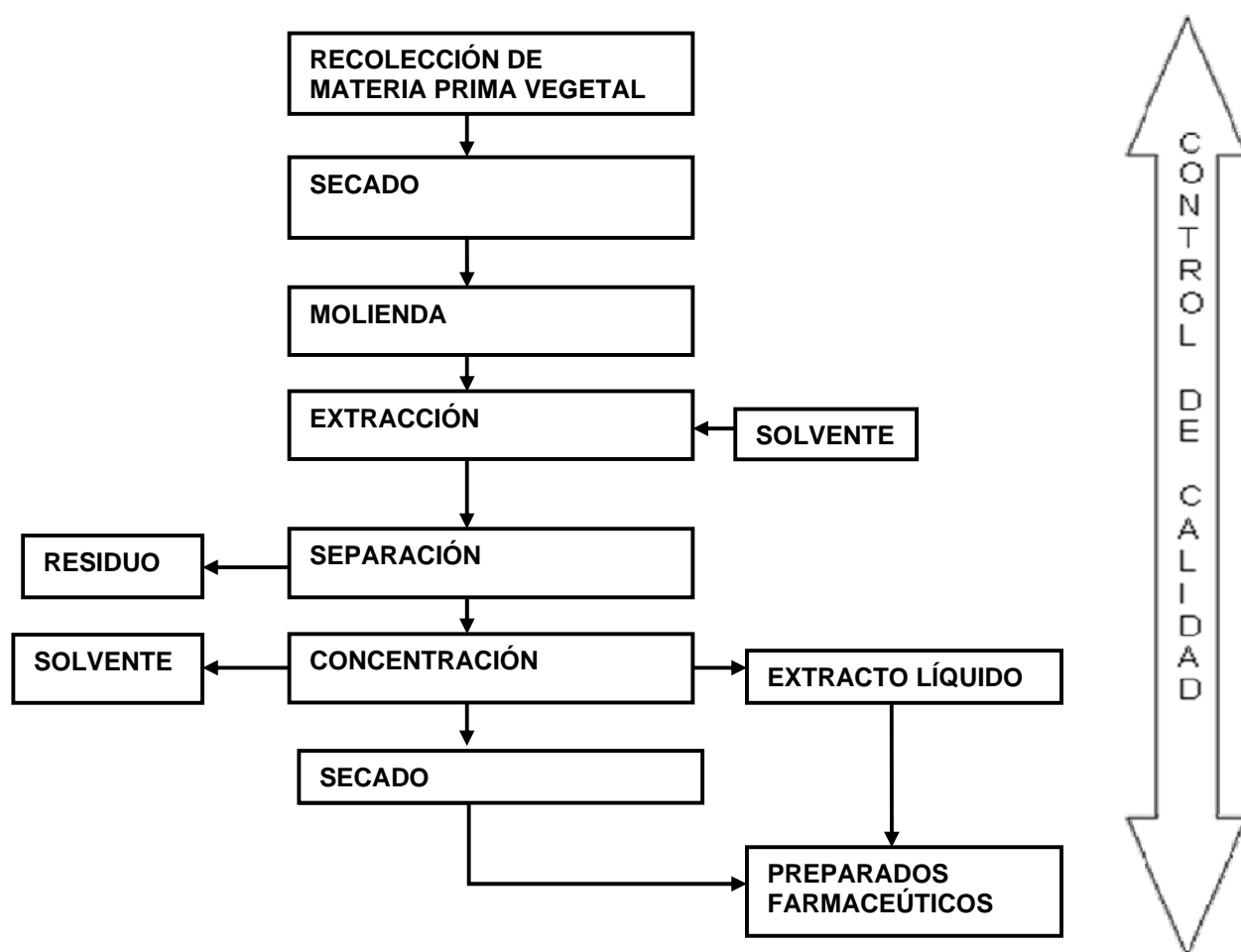


Figura 1.1 Proceso de obtención de extractos a partir de plantas medicinales

Tabla 1.1 Época óptima de cosecha de los diferentes órganos vegetales.

<b>Partes de la planta</b>	<b>Época de cosecha</b>
Hojas	Fase más activa de la fotosíntesis
Frutos	Cuando están totalmente desarrollados
Flores	Estado de botón floral
Raíces	Cuando están bien desarrolladas
Cortezas	En primavera, evitando períodos de lluvias intensas

Por regla general se recomienda secar el material vegetal antes del molinado lo que evita el riesgo de contaminación por hongos. Según Rivero (2002), quién evaluó la influencia de la preparación de la materia prima vegetal en el rendimiento del proceso de extracción, el

molinado del material después del secado permitió obtener un tamaño de partículas más pequeño y homogéneo, lo que favoreció la unión de las células con el solvente al existir mayor superficie de contacto entre éste y el material vegetal.

Las condiciones de secado deben ser estudiadas debidamente pues la humedad excesiva, la incidencia de sol directo y el polvo atmosférico deterioran el material destruyendo sus propiedades medicinales, con la consecuente disminución de la calidad de la materia prima. Lo recomendable es secar el material hasta aproximadamente un 10 % de humedad. Entre los métodos de secado más utilizados encontramos: secado en estufa, secado al sol y secado a la sombra, siempre teniendo en cuenta que el secado del material vegetal se debe realizar a condiciones moderadas de temperatura (Chife, 2005).

Para la reducción del tamaño del material vegetal existe una amplia variedad de equipos, se destacan los molinos de diferentes tipos como: molinos de cuchilla (corta y desgarrar), molinos de martillo (rompe y fragmenta) y molinos de rodillos (machaca y tritura). Durante el almacenamiento de la materia prima vegetal, debe ser evaluada su estabilidad ya que los procesos de envejecimiento que ocurren durante estas etapas pueden degradarla considerablemente (García, 1993).

#### **1.6.2 Especificaciones de calidad del extracto vegetal.**

Entre las especificaciones de calidad exigidas según la Regulación 28-02 del 2001, para la evaluación de materias primas vegetales con fines medicinales se encuentran:

- Características macroscópicas (forma, tamaño, caracteres superficiales, textura y fractura).
- Identificación y cuantificación de sustancias activas o marcadores.
- Sustancias solubles.
- Cenizas totales.
- Materias extrañas.
- Contenido de agua.
- Tamaño de partículas.
- Control microbiológico.
- Metales pesados.

### **1.6.3 Métodos de extracción.**

Según Treybal (1986), la extracción sólido-líquido es una operación que está presente prácticamente en todos los procesos tecnológicos relacionados con la industria química y médico-farmacéutica; dentro de ésta, los métodos de extracción por maceración y la percolación o lixiviación son los más utilizados (Pharmacopea,2007).

#### **1.6.3.1 Maceración.**

El material crudo previamente triturado se pone en contacto duradero con cantidad suficiente de solvente, en un tanque cerrado a temperatura ambiente durante 2-14 días hasta el agotamiento de la droga vegetal. Puede utilizarse agitación. Posterior a este tiempo la mezcla es filtrada, el material insoluble es lavado con el mismo solvente y los filtrados se mezclan para concentrar el extracto.

#### **1.6.3.2 Percolación o lixiviación.**

El material que se utilizó en el proceso anterior (maceración), que reúne las mismas características, se pone en contacto con una cantidad suficiente de solvente de forma tal que el solvente cubra la capa de sólido en el tanque percolador. El solvente se renueva de modo continuo manteniéndose un gradiente de concentración, el disolvente puro desplaza al que contiene la sustancia extraída sin ser necesario aplicar presión. La droga residual es prensada y el fluido obtenido es combinado con el percolado para concentrar el extracto.

### **1.6.4 Clasificación de los extractos vegetales.**

Según la Pharmacopea (2007), dependiendo del grado de concentración de los extractivos, los extractos pueden clasificarse en:

- Extractos fluidos o líquidos.
- Extractos semisólidos o blandos.
- Extractos secos.

#### **1.6.5 Obtención de extractos.**

Álvarez *et al.* (2007) y Carmona *et al.* (2006), plantean que es importante establecer los parámetros de extracción para lograr la estandarización del proceso, esto garantizará la calidad, rendimiento, seguridad y eficacia del producto medicinal por ejemplo:

- naturaleza química de la materia prima vegetal: conocer las características del metabolito o compuesto químico a extraer.

-selección del solvente: definir la selectividad del solvente a emplear, el solvente óptimo será el que logre extraer un mayor rendimiento del compuesto de interés.

-relación sólido-líquido: la proporción más conveniente de trabajo será aquella con la que se alcancen los mayores rendimientos de extracción.

-tamaño de partícula del sólido: de la forma y dimensión de los sólidos depende en gran medida el éxito de la lixiviación, a menor tamaño de partícula, mayor superficie de contacto entre la droga y el disolvente, y por tanto, mayor acceso de los principios activos al medio líquido; no obstante, tamaños de partícula muy pequeños conducen a la formación de polvos demasiado finos, que pueden causar problemas en el proceso de extracción.

-temperatura: el aumento de la temperatura favorece la extracción, hay que prestar especial atención cuando la sustancia de interés es termolábil o el menstruo es volátil, además, temperaturas elevadas pueden conducir a lixiviar cantidades excesivas de solutos indeseables.

-velocidad de agitación y tiempo de extracción: los óptimos valores de estos parámetros serán aquellos que logren extraer un mayor rendimiento del producto. A mayor tiempo de contacto, mayor capacidad tendrá el disolvente para alcanzar el equilibrio de concentraciones.

-viscosidad del medio: no deben seleccionarse solventes de viscosidad relativamente alta.

Según la Regulación 28-02 del 2001, el extracto vegetal obtenido se debe caracterizar en cuanto a: sustancias activas y marcadores, densidad, solventes residuales, sólidos totales, pH, control microbiológico y volumen total.

#### **1.6.6 La separación sólido líquido.**

La separación sólido-líquido se realiza con el objetivo de retirar el residuo de la droga después de la extracción. En la actualidad prácticamente en todos los procesos tecnológicos relacionados con la industria química y médico-farmacéutica se incluyen etapas de separación sólido-líquido sobre los cuales recae una gran importancia técnico-económica. La selección de un separador con este fin es una tarea mucho más compleja que la selección de otros equipamientos utilizados en los procesos tecnológicos. En la industria se emplean procedimientos de sedimentación, filtración (filtro nutche, prensa) o centrifugación (Carmona *et al.*, 2006).

Para la selección del equipo de separación adecuado hay que tener en cuenta el tipo de separación, tamaño de las partículas de los sólidos suspendidos, contenido de sólidos en la alimentación, densidad relativa de los componentes, capacidad de procesamiento deseado y capacidad abrasiva, inflamable o explosiva (García, 1993).

#### **1.6.7 Concentración de extractos.**

Según Álvarez *et al.* (2007), toda vez que se ha realizado la etapa de extracción y separación, se procede a eliminar parte del solvente de extracción para aumentar el contenido de sólidos en el extracto. Este proceso se realiza a presión reducida con lo que se disminuye la temperatura de calentamiento necesaria para la salida del solvente. El rotoevaporador es una buena alternativa para trabajos en el laboratorio y es ampliamente usado, mientras que sistemas análogos se utilizan a escala industrial (evaporadores, condensadores). También pueden utilizarse métodos de precipitación del principio activo, combinados con etapas de filtración, extracción líquido-líquido, entre otras.

#### **1.6.8 Secado.**

Para preservar los componentes naturales presentes en los extractos de plantas, se emplean métodos de secado para su obtención en forma de polvos. Estos pueden ser secados por atomización y lecho fluidizado fundamentalmente. En estos procesos es muy importante evaluar las variables: concentración de sólidos, temperatura de secado, humedad, presión, flujo y velocidad de trabajo, así como la utilización de aditivos inertes como coadyuvantes del secado para favorecer el rendimiento (López *et al.*, 2006 y López *et al.*, 2007).

### **1.7 Enfermedades producidas por enterobacterias.**

La familia Enterobacteriaceae constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram negativas. Reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del hombre (Puerta y Mateos, 2010).

#### **1.7.1 Escherichia coli.**

Recibe el nombre de colibacilosis, un grupo de enfermedades causadas por *Escherichia coli*, principalmente en el animal recién nacido, aunque también en animales de mayor edad. El término se utiliza para designar diversas manifestaciones entéricas en los humanos, lechones, becerros y corderos, principalmente y aves (Barnum *et al.*, 1967)

#### **1.7.1.1 Colibacilosis de los cerdos.**

Según Smith y Jones (1963), en los cerdos la colibacilosis se presenta como un cuadro de diarrea sin enteritis ni bacteremia y puede manifestarse en 4 síndromes:

- 1) Diarrea del recién nacido.
- 2) Diarrea a las 3 semanas de edad.
- 3) Diarrea al destete.
- 4) Enfermedad edematosa.

Sin embargo, hay quien afirma que en la mayor parte de los brotes de colibacilosis en porcinos de 2 a 3 días de edad la enfermedad es septicémica y se caracteriza por muerte súbita (Blood y Henderson, 1969).

Gyles (1972), estipula que cuando se aísla *E. coli* enteropatógena de los órganos internos de un lechón con diarrea del intestino delgado anterior, el diagnóstico es colibacilosis entérica más que colibacilosis septicémica. La enfermedad ocurre principalmente durante la primera semana de edad y se caracteriza por la pérdida de líquido y electrolitos con las heces, lo que produce deshidratación marcada que, inclusive, puede desencadenar la muerte. Es característico de un brote de colibacilosis en lechones recién nacidos que no todas las camadas están afectadas en un momento dado y que, frecuentemente no todos los lechones de una camada estén afectados.

La enfermedad edematosa, también conocida como edema intestinal del cerdo, ocurre principalmente en cerdos de rápido crecimiento a la edad de 8 a 12 semanas, frecuentemente varios días después del destete, vacunación, embarque a cambios en la dieta. Los cerdos afectados generalmente se encuentran muertos sin haber mostrado signos de enfermedad; sin embargo, cuando se observan, estos se refieren a incoordinación muscular, parálisis parcial y ceguera. Los párpados pueden estar engrosados por edema. La mayoría de los cerdos afectados mueren en un lapso no mayor de 24 horas. A la necropsia, la lesión característica es edema sanguinolento o rojizo de los tejidos. Puede encontrarse también edema en la submucosa de la región cardiaca del estómago, en el mesenterio, entre las espirales del colon, en los párpados, sobre los huesos frontales, los pulmones, y ocasionalmente en el tejido subcutáneo a 10 cm de largo de la línea medio ventral o garganta. Los ganglios linfáticos mesentéricos frecuentemente están aumentados de volumen y exudan líquido en abundancia al ser cortados. Puede haber exceso de líquido

seroso en las cavidades pleural, pericárdica o peritoneal. Ocasionalmente no se encuentra edema en los tejidos de cerdos con enfermedad edematosa (Barnum *et al.*, 1967).

#### **1.7.1.2 Colibacilosis de los becerros.**

Según Gay (1965), la colibacilosis se presenta en todas las razas de ganado bovino, tanto de carne como de leche, principalmente durante las primeras 2 semanas de edad. Los síndromes asociados a la colibacilosis de los becerros han sido clasificados en 3 sobre la base de hallazgos clínicos y bacteriológicos, y tomando en cuenta la posible patogenia:

1) Colisepticemia. La mayoría de los casos de colibacilosis septicémica suceden durante los primeros días de vida. Los becerros enfermos presentan fiebre y se encuentran débiles. Tienen frecuencia cardíaca y respiratoria elevadas y puede o no haber diarrea. La colisepticemia es más frecuente en becerros privados de calostro. El becerro muere rápidamente a causa de una fase de bacteremia. En algunos casos, el curso de la enfermedad es más prolongado y *E. coli* se localiza en los tejidos de uno o más órganos, dando origen a una variedad de síndromes clínicos. *E. coli* parece tener predilección por las articulaciones y las meninges, de tal manera que la poliartritis y la meningitis son secuela frecuente de la septicemia.

2) Enterotoxemia. Caracterizada también por colapso y muerte rápida del becerro. Sin embargo, está asociada con la proliferación de ciertas cepas de *E. coli* en el intestino, sin bacteremia. La muerte es producto quizá de una toxemia.

3) Colibacilosis entérica. Es parte del síndrome diarreico. La muerte puede ocurrir o no dependiendo de la severidad de los desajustes fisiológicos.

#### **1.7.1.3 Colibacilosis de los corderos.**

Según Sojka (1971), la colibacilosis se considera la causa más importante de mortalidad en corderos y se reconocen dos manifestaciones de infección: Sistémica y Entérica. La forma más frecuente es la septicémica hiperaguda, siendo afectados 2 grupos de edad, principalmente de 1 a 2 días y de 3 a 8 semanas. Incluye bacteremia generalizada con colapso súbito y poca o no diarrea, o bien, infección localizada con signos nerviosos (meningitis y/o artritis). Sin embargo la diarrea colibacilar de los corderos, de 2 a 8 días de edad, produce depresión, anorexia, deshidratación y, en algunos casos, muerte.

#### **1.7.1.4 Colibacilosis de las aves.**

La infección por *E. coli* en las aves tiene una gran variedad de manifestaciones, incluyendo enteritis, artritis, infección del saco vitelino (onfalitis), colisepticemia, peritonitis, salpingitis, e infección de los sacos aéreos. La colisepticemia es una enfermedad principalmente de pollos de engorde de 6 a 10 semanas de edad, pero también ocurren casos en pollitos jóvenes, pavos y otras aves. La enfermedad se caracteriza por pericarditis fibrinosa e inflamación de los sacos aéreos (Gross, 1972).

#### **1.7.2 Pseudomonas aeruginosa.**

*Pseudomonas aeruginosa*, es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la rama y de las proteobacterias, misma a la que pertenecen las enterobacterias. Dentro del género *Pseudomonas* se encuentran también algunas otras especies como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* y *P. alcaligenes*. *P. aeruginosa* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. Se puede aislar de muestras de suelo, aguas prístinas y contaminadas, así como de plantas y animales (Pace, 1997).

Según Carter (1979), en el cerdo se aísla de los enfermos con rinitis atróficas. En el humano se ha demostrado que es el agente que produce el pus azul en heridas infectadas, es frecuente la aparición de otitis con otorrea al igual que en el perro. Las lesiones localizadas acontecen en regiones de heridas o quemaduras.

#### **1.8 Bacterias Gram positivas.**

Las bacterias Gram positivas son aquellas que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram: de aquí el nombre de "Gram positivas" o también "grampositivas". Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. Son uno de los principales grupos de bacterias, y cuando se tratan como taxón se utiliza también el nombre de Posibacteria (Zadoks, 2002).

##### **1.8.1 Staphylococcus aureus.**

Los *Staphylococcus* son cocos Gram positivos que se presentan sueltos, en parejas, en pequeñas cadenas y más característicamente en grupos irregulares en forma de racimos (Vadillo *et al.*, 2002).

Según Fitzgerald *et al.* (2001), las infecciones debidas a *S. aureus*, como el síndrome del choque tóxico y la mastitis en las vacas y ovejas, tienen gran importancia en la Medicina Veterinaria

En muchos países *S. aureus* es un patógeno importante que causa mastitis bovina (Bjorland *et al.*, 2001). En 1998 Smith informó de un brote de mastitis causada por *S. aureus*, en el estado de Washington en un hato lechero (Middleton *et al.*, 2002); y en Nueva Zelanda el *S. aureus* y *Streptococcus spp* son los agentes etiológicos más comunes involucrados en los casos clínicos y subclínicos de la mastitis en los hatos lecheros (Douglas *et al.*, 2000).

La interacción de la bacteria con las células de la glándula mamaria bovina es considerada esencial en el desempeño de la patogénesis de la mastitis (Lammers *et al.*, 2000).

El primer paso en las infecciones por este patógeno es la adherencia a las diferentes superficies y colonización de tejidos del organismo infectado. Para este propósito presenta una familia de adherencias llamada MSCRMMs (componentes de la superficie microbianos que reconocen las moléculas de la matriz adhesivas). Estas interacciones le permiten adherirse a una variedad de líneas celulares y promover la invasión y muerte por apoptosis de células epiteliales infectadas. Otro paso en la colonización de esta bacteria es la formación de una biopelícula. Esto es una preocupación importante en las infecciones porque protege a los microorganismos de la opsonofagocitosis y antibióticos, haciendo una infección crónica y contagiosa (Cucarella *et al.*, 2002).

La prevención de la transmisión del patógeno de vaca a vaca reduce la incidencia de mastitis. Sin embargo, cuando son implementadas las medidas de control de la mastitis, nuevas infecciones continúan ocurriendo, y la erradicación del *S. aureus* de las infecciones intramamarias es difícil de lograr (Zadoks, 2002).

### **1.9 Enfermedades micóticas.**

Dentro de las micosis, las producidas por levaduras del género *Candida* son las de más frecuente presentación, contando con un gran número de formas clínicas. Estas enfermedades por su envergadura pueden ser sistémicas o superficiales (Adam y Telcki, 1975).

#### **1.9.1 *Candida albicans*.**

Con el término candidiasis se nombran numerosas infecciones provocadas por levaduras del género *Candida*. Dentro de este, *Candida albicans* es el agente etiológico de mayor importancia en este tipo de patologías. Al microscopio se observa como células redondeadas, ovals (3-7 mm de diámetro) o gemantes las cuales quedan unidas para formar pseudomicelios o se alargan para formar micelio. La especie *Candida albicans*, dentro

del género, produce tubos germinativos. En agar Sabouraud crecen formando colonias blancas, blandas, cremosas y lisas (Macola, 2001).

Entre las enfermedades que más afectan al cerdo, principalmente en sus primeras semanas de vida, se encuentran las diarreicas agudas, las cuales producen altos índices de morbilidad y letalidad, lo que constituye un problema permanente, propio de los sistemas modernos de crianza de cerdos. El hecho de que el síndrome diarreico esté constituido por la incidencia de varios factores patogénicos, con más o menos grado de participación y que a su vez sea una entidad polietiológica, ha significado un gran reto para la farmacología y la terapéutica médica (Adam y Telcki, 1975).

## **CAPÍTULO 2. Materiales y Métodos**

### **2.1 Caracterización del área de estudio.**

#### **2.1.2 Localización.**

El experimento se llevó a cabo en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”, situada a los 22° 48' y 7" de latitud Norte y 79° 32' y 2" de longitud Oeste, a 19 msnm, en el municipio de Perico, provincia de Matanzas, Cuba (Academia de Ciencias de Cuba, 1989).

#### **2.1.2 Clima.**

En la tabla 2.1 se muestran las principales características climatológicas, que presentaba el área experimental durante el proceso de colecta del material vegetal y la caracterización botánica de los árboles de *Gliricidia sepium* (tomado de los registros mensuales de la estación meteorológica ubicada en las áreas de la Institución).

El acumulado anual de las precipitaciones del período en estudio fue de 1 267,6 mm. Este resultado es relativamente inferior al acumulado histórico de los 15 años anteriores a la etapa de investigación debido a que cayeron 106,6 mm menos; siendo septiembre el mes de mayor precipitación con 315,2 mm, mientras que febrero y marzo del 2011 fueron los más secos con 0 y 6,8 mm, respectivamente. La mayor cantidad de lluvias se produjo entre los meses de mayo a octubre, lo que representó el 89,1% de la precipitación anual.

La temperatura promedio mensual se mantuvo por encima de 19°C y no sobrepasó los 28°C con una media anual de 23,7°C; valor que se situó un grado Celsius por debajo de la temperatura media histórica. Entre los meses de mayor temperatura se destacó junio con un promedio de 28°C mientras que en marzo y diciembre del 2010 se detectaron las temperaturas promedio más bajas (19,7 y 17,1°C, respectivamente). La humedad relativa del aire fue generalmente alta y osciló entre 70-86%, con un promedio anual de 79,3%.

#### **2.1.3 Suelo.**

El suelo es de topografía llana, con pendiente de 0,5 a 1,0%, y está clasificado por Hernández *et al.* (2003) como Ferralítico Rojo lixiviado, húmico nodular ferruginoso hidratado, de rápida desecación, arcilloso y profundo sobre calizas, con un pH ligeramente ácido de 6,2-6,4.

Tabla 2.1. Indicadores climatológicos durante el período de evaluación.

Años	Meses	Precipitaciones (mm)	Temperatura media (°C)	Humedad relativa media (%)
2010	Marzo	20,9	19,7	77
	Abril	108,3	23,3	74
	Mayo	62,1	26,3	77
	Junio	161,3	28,0	79
	Julio	259,7	26,7	84
	Agosto	226,0	26,8	85
	Septiembre	315,2	26,2	86
	Octubre	104,9	24,4	86
	Noviembre	73,7	21,7	81
	Diciembre	6,9	17,1	79
2011	Enero	51,0	20,3	78
	Febrero	0	21,3	75
	Marzo	6,8	21,6	70
<b>Acumulado</b>		<b>1267,6</b>		
<b>Promedio anual</b>			<b>23,7</b>	<b>79,3</b>
<b>Acum. histórico</b>		<b>1374,2</b>		-
<b>Promedio histórico</b>			<b>24,7</b>	-

Acum. histórico : Acumulado histórico en los 15 años anteriores al período experimental.

## 2.2 Caracterización del material biológico (flores de *Gliricidia sepium* y miel de la abeja *Melipona beecheii*).

### 2.2.1 Recogida de material vegetal en campo.

Las flores fueron recolectadas (400 g) en las primeras horas de la mañana de forma manual a diferentes alturas de los árboles seleccionados. Se guardaron en bolsas de polietileno e inmediatamente se introdujeron en un cubo con hielo con el objetivo de evitar la degradación enzimática que ocurre normalmente en las muestras vegetales. Posteriormente se transportaron al Laboratorio de Biotecnología de la EEPF-IH donde fueron procesadas.

El material fresco fue lavado con agua destilada y secado sobre papel de filtro para eliminar el exceso de líquido. Se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

El material seco de las flores fue lavado con agua destilada, secado en estufa a 80°C durante 72 horas, tamizado hasta obtener fragmentos inferiores a 1 mm, envasado herméticamente en frasco ámbar y conservado a 4°C hasta su uso.

### **2.2.2. Metodologías empleadas para la caracterización botánica de *Gliricidia sepium*.**

De los 165 árboles de *Gliricidia sepium* presentes en la cerca de la entrada principal de la Institución se muestrearon 20, lo que representó el 12% del total. Las variables que se midieron fueron las siguientes:

- Altura total: Para la medición se utilizó un hipsómetro mecánico Carl Leiss, el cuál se colocó a una distancia de 15 m desde el árbol al punto de medición y a una altura coincidente con los ojos del muestreador (1,63 m).
- Diámetro del tronco (DAP): Se realizó a 1,30 m, coincidente con la altura del pecho del muestreador (Aldana y Frías, 1986).
- Copa: El ancho de la copa se midió con el empleo de una cinta métrica. Se realizaron dos observaciones, una de Norte a Sur y otra de Este a Oeste y luego se promediaron ambas medidas.
- Estimación total de la cantidad de flores (por árbol y por ha): A las ramas seleccionadas se les contó el número de racimos que las componían, seleccionando 5 racimos por árbol (lo que representó el 1,7% del total de racimos) y a su vez la cantidad de flores que presentan cada uno con el fin de estimar el rendimiento de flores por árbol y luego por hectárea. Este último cálculo se llevó a cabo según el marco de siembra de 3,0 x 3,72 m.

### **2.2.3 Determinación de la composición bromatológica de las flores de *G. sepium*.**

Se tomó una muestra homogénea de 300 g de flores y se envió al Laboratorio de Análisis Químico de la EEPF Indio Hatuey para determinar su composición química: materia seca (MS), proteína bruta (PB), fibra bruta (FB) y calcio (Ca), según las técnicas descritas por AOAC (1990). Para la determinación del peso de la muestra se utilizó una balanza analítica de la casa comercial Sartorius.

#### **2.2.3.1. Determinación de la humedad en la muestra.**

La determinación de la humedad fue efectuada aplicando el “Método estándar para la determinación de sólidos totales en la biomasa” (Sluiter *et al.*, 2008 a). Este método se basó en el análisis gravimétrico por volatilización indirecta.

Sobre el fundamento de este método se siguió el siguiente procedimiento: se pesó exactamente 1 g de la muestra, la cual fue colocada en estufa a 105°C (AISET® YLD-6000 P\G2007ba, R.P. China). Esta se pesó nuevamente y se repitió la operación hasta obtener un peso constante (hasta que en dos pesadas consecutivas se obtuvo diferencias de no más de 0,2 mg). Posteriormente se enfrió en la desecadora con cloruro de calcio anhidro y silicagel. Luego se pesó en una balanza analítica digital (Sartorius BS 124 S. Max 120g, con una precisión de 0,1mg, China). El contenido de humedad se determinó mediante la siguiente expresión:

$$H = \frac{PRMH - PRMS}{PRMH - MPRS}$$

Donde:

H: humedad.

PRMH: peso del recipiente con la muestra húmeda.

PRMS: peso del recipiente con la muestra seca.

MPRS: peso del recipiente seco.

#### 2.2.3.2. Determinación de hidrólisis ácida analítica (HAA) y lignina de Klason.

La lignina de Klason se determinó como el residuo de la hidrólisis ácida analítica a las muestras de biomasa (Sluiter *et al.*, 2008 b). El procedimiento se basó en el análisis gravimétrico para la cuantificación de la lignina y la extracción sólido-líquido para la determinación de los azúcares. En un tubo de ensayo se mezclaron 0,3 g de muestra pesada en balanza analítica, con 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (72%). A continuación se introdujeron en baño de María(a 30°C), durante una hora con agitación constante asegurándose que la muestra quedara empapada por el líquido. Luego se añadió 84 mL de agua destilada para detener la reacción (equivalente a una concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> del 4%). Seguidamente, se introdujo en autoclave durante 1 h a 121°C y 1,02 atm de sobrepresión. Finalizada esta segunda etapa de hidrólisis, se enfrió en baño de agua y se repusieron las posibles pérdidas con agua destilada. Tras la hidrólisis se obtuvo una suspensión en la que el hidrolizado (fracción líquida) contenía los productos de hidrólisis de los polisacáridos y el precipitado correspondiente a la lignina Klason, la cual se secó a 105°C durante 24 horas en estufa. Para determinar el por ciento de lignina se utilizó la ecuación:

$$CLK = \frac{PRMS - PRS}{PMH * (1 - H)} * (100 - CE)$$

Donde:

CLK: contenido de lignina de Klason.

MRMH: peso en gramos del crisol con la muestra húmeda.

PRS: peso en gramos del crisol seco.

PMH: peso en gramos del MLC húmedo inicial.

H: humedad de la muestra.

CE: contenido de extractos.

#### **2.2.4 Metodología empleada para la caracterización de la miel de *Melipona beecheii*.**

Se trabajó con 6 colmenas las cuales fueron trashumadas hacia el área donde se hallaban los árboles de *G. sepium* al momento de la floración, previo haberse realizado una castra de limpieza. De ellas se extrajo un toral (ánfora) sellado de polen y 25 mL de miel del 50% del total de las colmenas. Las muestras se colectaron con la mayor higiene posible de las colmenas en cajas de madera (40 cm de largo por 10 de ancho), del modelo Pablo Nogueira Neto (PNN), (Nogueira Neto, 1997), que se encontraban en el centro de una arboleda, perteneciente al módulo de ganado menor de la EEPF “Indio Hatuey”; las cuales se trajeron de la localidad de Jagüey Grande, de la provincia de Matanzas, el 23 de marzo del año 2007. Para ello, se utilizaron jeringuillas estériles y frascos secos esterilizados debidamente etiquetado. Posteriormente, las tres muestras fueron remitidas al Instituto de Ecología y Sistemática (IES) de Cuba para realizar un estudio palinológico con la finalidad de determinar cuál de ellas contenía vestigios de procedencia botánica perteneciente a la especie *Giliricidia sepium*.

##### **2.2.4.1 Estudio palinológico.**

El estudio se llevó a cabo sobre la base de un inventario florístico del área, en el 2009 (Milera *et al.* – datos no publicados) alrededor del emplazamiento del meliponario, teniendo en cuenta el radio de vuelo de las abejas. El análisis de laboratorio se realizó siguiendo los métodos de acetolisis y solución acuosa caliente de carbonato de sodio o de potasio (Sánchez, 2001).

Posteriormente, a la muestra que se reportó presencia de granos de polen pertenecientes a *G. sepium* se le practicó un análisis sensorial y físico-químico en el Centro Nacional de Higiene de los Alimentos (IMV), de la Ciudad de La Habana según la metodología descrita en

la Norma Cubana 74-02:88 (1979), referente a: aspecto, color, olor, sabor, textura, humedad (g/100 g) máx, acidez (meq/100 g) máx,

p H, sólidos solubles (g/100 g = %). En la EEPF Indio Hatuey se le realizó una determinación por HPLC de: glucosa (g/100 g) máx, fructosa (g/100 g) máx y sacarosa (g/100 g) máx.

#### **2.2.4.2 Determinación cromatográfica de los azúcares presentes en el macerado de flores de *G. sepium* y la miel de *M. beecheii* mediante la Cromatografía Líquida de Eficiencia Elevada (HPLC).**

Para la determinación de azúcares se utilizó un sistema de HPLC Young Lim (República de Corea). La glucosa, la fructuosa y la sacarosa fueron separadas en una columna IC Sep COREGEL-87 H355 (7,8 x 300mm) a 60±1°C utilizando como fase móvil agua desionizada a un flujo de 0,4 mL/min, estos azúcares fueron detectados con un refractómetro diferencial (RID, YL 9170). El software de adquisición de datos Clarity (YL 9100 HPLC, USA) fue empleado como interfase para realizar los análisis, obtener los resultados y controlar todo el sistema. La concentración de la miel que se preparó para inyectarla al HPLC fue de 10,95 g/L, o sea, se pesaron 2,7394 g de miel y se diluyeron en 250 mL de agua.

### **2.3 Preparación de los extractos vegetales.**

Para los extractos frescos de *Gliricidia sepium*, las flores previamente lavadas y secadas fueron pesadas, maceradas en nitrógeno líquido y homogenizadas en una solución tampón fosfato de sodio, 100 mM, pH 7,0 en frío y con una relación masa/volumen 1:1. Las muestras se centrifugaron a 4°C, 5000 r.p.m. durante 20 minutos y se colectó el sobrenadante para los diferentes ensayos. La concentración final fue de 1g/mL.

Los extractos etanólicos y metanólicos, tanto de las muestras secas como las frescas se realizaron como se describe a continuación. Se pesaron 30 gramos del material vegetal, se adicionó 100 mL del solvente (etanol o metanol) y se maceró a temperatura ambiente durante 5 días con agitaciones intermitentes. Se sonificó en baño ultrasónico MRC por 15 minutos y se filtraron.

### **2.4 Cromatografía en Capa Delgada.**

Según Medinilla (2001), la cromatografía en capa fina consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de adsorbente, retenida sobre una superficie plana. Una solución de la muestra que va a ser

analizada se aplica por medio de un capilar sobre la superficie de un adsorbente inerte (sílica, alúmina, etc); distribuido sobre una placa de vidrio o aluminio. La placa se coloca verticalmente dentro de una cámara previamente saturada, con el vapor del eluente adecuado, de tal forma que la parte inferior de la placa que contiene la muestra entre en contacto con la fase móvil. El eluente migra por capilaridad en la placa cromatográfica, separando por migración diferencial los diversos componentes de la mezcla. Después que ha ocurrido, se evapora el eluente y la placa se analiza utilizando luz UV o luz Visible, o aplicando reactivos que dan como resultado reacciones de coloración con las sustancias contenidas en la mezcla analizada.

Para la realización de este método fueron utilizadas placas de vidrio recubiertas con una suspensión de sílica gel 60 G de Merck en agua destilada (1:2): 0,25 mm de espesura para CCDS analítica, activada a 100°C en estufa.

#### **2.4.1 Detección de flavonoides según la metodología de Wagner *et al.* (1984).**

La siembra de los extractos se efectuó a una distancia de 0,5 cm y se realizó en la forma de punto con un tubo capilar de 0,5 microlitros. Como estándar se empleó una solución de flavonoides (Quercetina y Rutina) al 0.05 % en metanol (10 µL).

a) Fase móvil: n-butanol-ácido acético-agua (40:10:50)

Detección: UV 254 nm.

b) Fase móvil: 27 mL de diclorometano y 3 mL de metanol.

Detección: Reactivo de Productos Naturales (NP/PEG) a UV-366 nm.

Solución A: Solución metanólica de difenilboriloxietilamina a 2 %.

Solución B: Solución etanólica de polietileno glicol-4000 a 5 %.

Resultado Positivo: Fluorescencia intensa en ambas longitudes de onda (254nm y 366nm). Dependiendo de la estructura, fase móvil y detección, fluorescen amarillo, azul o verde.

#### **2.4.2 Detección de antraquinonas según la metodología de Wagner & Bladt (2001).**

La siembra de los extractos se efectuó a una distancia de 0,5 cm y se realizó en la forma de punto con un tubo capilar de 0,5 microlitros.

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:17:13).

Detección: UV 254 nm y vapores de yodo.

Resultado Positivo: se observaron las manchas fluorescentes amarilla, verde o rojo-café.

#### **2.4.3 Detección de alcaloides según la metodología de Wagner *et al.* (1984).**

La siembra de los extractos se efectuó a una distancia de 0,5 cm y se realizó en la forma de punto con un tubo capilar de 0,5 microlitros.

Fase móvil: 27 mL de diclorometano y 3 mL de metanol.

Detección: Se utilizó el Reactivo de Dragendorff.

Solución A: Nitrato de bismuto,  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ , (0,85 g) disuelto en una solución de ácido acético glacial (10 mL) en agua destilada (40 mL).

Solución B: 20 mL de solución acuosa de ioduro de potasio (KI) al 40%.

Se combinaron las dos soluciones obteniéndose una solución madre. La solución para la pulverización se preparó adicionando 20 mL de la solución madre, 20 mL de ácido acético glacial y 60 mL de agua destilada.

Resultado Positivo: Se observaron manchas de color anaranjado.

#### **2.4.4 Detección de saponinas según la metodología descrita por Wagner & Bladt (2001).**

La siembra de los extractos se efectuó a una distancia de 0,5 cm y se realizó en la forma de punto con un tubo capilar de 0,5 microlitros.

Fase móvil: cloroformo/ácido acético glacial/metanol/agua (64:32:12:8).

Detección: UV 254nm y vanilina- Ácido Sulfúrico (Reactivo de Godin).

vanilina- Ácido Sulfúrico

Estas dos soluciones fueron utilizadas como Reactivo de Godin.

Solución A: Solución etanólica de vanilina a 1%.

Solución B: Solución etanólica de ácido sulfúrico a 5%.

Pulverización de placa con la solución A, seguida de la solución B y se calentó a 100°C. Es un reactivo general, que también fue utilizado para detección de terpenoides, derivados de fenilpropanos y fenoles.

Resultado Positivo: Se produjeron manchas de color rosas o azules.

#### **2.4.5 Detección de terpenos, taninos condensados, flavonoides y saponinas según la metodología de Cannell (1998).**

La siembra de los extractos se efectuó a una distancia de 0,5 cm y se realizó en la forma de punto con un tubo capilar de 0,5 microlitros.

Fase móvil: Acetato de etilo/metanol (60:40).

Detección: vanilina- ácido sulfúrico (Reactivo de Godin) referido en el apartado 2.4.4.

Resultado Positivo: Se produjeron manchas de color rosas o azules.

### **2.5 Estudios microbiológicos.**

#### **2.5.1 Cepas de microorganismos.**

Las cepas bacterianas utilizadas fueron: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*. Todas suministradas por el Centro de Higiene y Epidemiología de la ciudad de Cárdenas, provincia Matanzas provenientes de aislamientos clínicos en pacientes.

#### **2.5.2 Medios de cultivo.**

Los medios de cultivo utilizados son enriquecidos, lo que permite el crecimiento de los microorganismos sin dificultad. Para las bacterias se utilizó medio Mueller Hinton (líquido y sólido), esterilizados en autoclave a 121°C y una atmósfera durante 20 minutos.

#### **2.5.3 Controles.**

Como controles negativos se utilizó una solución de agua peptonada al 0,85%, etanol al 70% y metanol al 70%. En el caso de los controles positivos se empleó, para el método de perforaciones en agar: ciprofloxacino (50 mg/mL), kanamicina (50 mg/mL), nistatina (50 mg/mL), clotrimazol (50 mg/mL), amoxicilina (50 mg/mL), cefalexina (50 mg/mL). Para el método de disco-placa-cultivo los discos de antibióticos siguientes: ciprofloxacín (5 µg), cefoxitín (30 µg), colestín sulfato (30 IU).

#### **2.5.4 Ensayo de microdilución**

##### **2.5.4.1 Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos.**

La actividad antibacteriana de los extractos se evaluó por el método de microdilución en placa, descrito por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (Wayne, 2002a, 2002b).

#### **2.5.4.2 Preparación de los extractos y controles.**

Los extractos en estudio se prepararon a una concentración de 4 mg/mL en medio de cultivo. Se utilizaron 50 µL de etanol y metanol respectivamente para disolver el extracto. Se realizaron diluciones seriadas para cada extracto: desde 1000 a 0.95 µg/mL.

**Controles:** Para el bioensayo antibacterial se utilizaron: ciprofloxacina, kanamicina, nistatina, clotrimazol, amoxicilina y cefalexina. Se adicionó 5 µL de una solución stop de 50 mg/mL. Además se utilizaron controles de crecimiento de los microorganismos, de solventes utilizados (agua peptonada, etanol y metanol) y de esterilidad del medio de cultivo Mueller Hinton para bacterias.

#### **2.5.4.3 Preparación de los inóculos.**

Para la preparación de los inóculos se obtuvieron cultivos jóvenes de las cepas de bacterias en el medio sólido de Mueller Hinton. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas. Para las bacterias se preparó una suspensión para cada una de las cepas al 0.5 de McFarland y se realizó una dilución 1:50 con medio Mueller Hinton para obtener una suspensión de trabajo.

#### **2.5.4.4 Descripción de la técnica de microdilución de placa.**

En una placa de 96 pocillos se colocaron 100 µL del medio Mueller Hinton (bacterias), en el primer carril. Se añadieron 100 µL de la solución del extracto, y a partir de éste se realizaron diluciones seriadas. En cada placa se incluyeron controles de medio de crecimiento y de inhibición. El control de medio de crecimiento fue un pozo conteniendo únicamente 100 µl de medio de cultivo. Las placas se incubaron a 37°C. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó por lectura visual a las 24 horas para las bacterias y a las 48 horas para las levaduras. Se realizaron 2 repeticiones por réplica. La concentración mínima inhibitoria (CMI) es definida como la concentración más baja de extracto que inhibe el crecimiento celular.

#### **2.5.5 Ensayo de la actividad antimicrobiana.**

Se prepararon los precultivos de los microorganismos en el medio líquido Mueller Hinton y se dejaron crecer en agitación (100 rpm) durante 20 horas a 37°C. Los microorganismos se inocularon en el medio agarizado correspondiente, previamente fundido y mantenido a 45°C. El inóculo debía permitir un crecimiento en césped con una concentración de  $10^8$  cél/mL.

#### 2.5.5.1 Método de perforaciones en agar.

Luego de la solidificación del medio, se hicieron 6 perforaciones de 0,8 cm de diámetro, donde se colocaron 100 µL del extracto que se debía evaluar, así como de los controles negativo y positivo. Se realizaron 10 réplicas por tratamiento para cada microorganismo.

#### 2.5.5.2 Método de disco-placa-cultivo.

El método disco-placa-cultivo, se realizó con discos de sensibilidad que se prepararon utilizando papel Wattman No. 3 de 6 mm de diámetro. Se utilizaron los extractos metanólicos y etanólico a razón de 100 mg/mL. Los controles antibióticos fueron similares a los descritos con anterioridad. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas, después de lo cual se procedió a la lectura de los diámetros de las zonas de inhibición. Estos discos fueron esterilizados en autoclave a 121°C y 1 atmósfera de presión durante 15 minutos. Luego se procedió a agregar a cada uno de los discos 15 µl de las concentraciones de los extractos vegetales.

#### 2.5.5.3 Incubación, crecimiento microbiano y efecto inhibitorio.

Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas y después se evaluaron los resultados mediante la lectura, en milímetros, del diámetro del halo de inhibición del crecimiento de los microorganismos. El cálculo del porcentaje del efecto inhibitorio relativo respecto al control positivo, realizándose de la manera siguiente:

$$EI = \frac{MDHIE}{MDHICP} * 100$$

Donde:

*EI (%)*: efecto inhibitorio del extracto con respecto al control positivo

*MDHIE*: media del diámetro del halo de inhibición del extracto

*MDHICP*: media del diámetro del halo de inhibición del control positivo

#### 2.6 Procesamiento estadístico.

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado. Para determinar la existencia de diferencias entre los tratamientos, en función del diámetro del halo de inhibición, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis al no cumplirse los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad, utilizando el software Infostat versión Libre para Microsoft Windows, para un 5% de significación.

## CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Caracterización morfológica de los árboles de *Gliricidia sepium*.

*Gliricidia sepium* es una leguminosa arbórea multipropósito que se distribuye en el trópico y representa un gran potencial en la alimentación animal. En esta tesis se realizó una caracterización morfológica de 20 árboles de *G. sepium* de donde se extrajeron las flores utilizadas para los extractos que se evaluaron.

En la tabla 3.1 se muestran los valores de los indicadores cuantitativos de la caracterización botánica de los árboles de *G. sepium*. Como se puede observar la media del diámetro del tronco a la altura del pecho (DAP) fue de 44,7 cm. Esta medida se encuentra en el rango encontrado por Alvarez y Varona (1988) quienes definieron a *G. sepium* como un árbol pequeño, caducifolio y de crecimiento rápido, con un diámetro a la altura del pecho entre 40 y 70 cm. Elevitch y Francis (2006) y Pennington y Sarukhán (2005) coinciden en que el diámetro oscila entre los 25 cm y 60 cm, aunque normalmente suelen ser pequeños (de 30 cm).

Tabla 3.1. Indicadores cuantitativos de la caracterización botánica.

Estadísticos	DAP (cm)	Altura (m)	Diámetro de la copa (cm)	Número de Racimos	Número de flores por racimo	Total de flores por árbol	Total de flores por ha
Media	44,7	4,85	372,35	295	34	1 0 030	8 986 880
EE ±	3,71	0,25	24,94	20,13	1,53	-	-

La altura alcanzó una media de 4,85 m, coincidiendo con Mora (1983), quien describió a la gliricidia como una planta perenne que presenta raíces profundas, ramificadas y que puede alcanzar una altura de 4 a 5 metros. Estos resultados indican que los árboles muestreados son típicos de la especie en términos de DAP y la altura y que estos se encontraban en pleno desarrollo conforme a los valores alcanzados para ambos indicadores. Por su parte, Standley y Williams (1964) y Morton (1981) describieron que las flores se encuentran agrupadas en racimos de 5-10 cm de largo, densamente florecidos. En la investigación que se llevó a cabo se logró estimar el número de racimos por rama, resultado en el que se obtuvo una media de 295 racimos por árbol.

La inflorescencia en *G. sepium* se presenta en racimos axilares, indicador en el que se detectó un valor de 34 flores como promedio. Este resultado coincide con el rango planteado por Barrance *et al.* (2003), quienes describieron a las flores como papilionadas (típicas de la

subfamilia *Faboideae*) que se disponen en racimos cortos que se curvan hacia arriba, de hasta 15 cm de largo, con 30-100 flores en cada uno.

Little (citado por Parrotta, 1992) consideró que las flores individuales de esta especie, son de aproximadamente 2 cm de largo y crecen en pedúnculos delgados. Las mismas constan de un cáliz acampanado con cinco indentaciones, de color verde claro con acentos rojos y una corola en forma de guisante de cinco pétalos rosados blanquecinos o con acentos morados. Estas flores poseen un estandarte o pétalo superior amplio, amarillento cerca de su base, dos alas oblongas y curvas, y dos pétalos unidos formando una quilla; además poseían 10 estambres blanquecinos; 9 de ellos se encuentran unidos para formar un tubo y el otro se encuentra separado. El pistilo tiene un ovario rojo, estrecho y pedunculado, y un estilo doblado y blanquecino.

El total de flores estimadas por árbol fue de 10 030, valor que se considera adecuado debido a la profusa floración que caracteriza a esta especie. Por su parte, el estimado total de flores por hectárea, (para lo que se asumió un marco de siembra 3,0 x 3,72 m), fue de 8 986 880 flores. Ello puede atribuirse a las características genotípicas de la planta, a las condiciones edafoclimáticas existentes durante la investigación (tabla 2.1 correspondiente al apartado de Materiales y Métodos) en función de la interacción genotipo-ambiente, ya que tanto el suelo como las precipitaciones y la temperatura media determinaron un marco propicio para el desarrollo de las plantas y la producción de flores.

En ese sentido, el acumulado anual de las precipitaciones en el período de evaluación fue de 1 267,6 mm. Este valor está en correspondencia con el rango óptimo de lluvias anual que Glover (1989) establece para *G. sepium* (900 mm-1 500 mm). Además, la temperatura, que como se plantea en la literatura, es el elemento climático que más interactúa como factor limitante para esta especie, fue de 23,7°C (tabla 2.1) y está comprendida dentro del rango que informa la misma autora para este árbol leguminoso que es de 20°C a 29°C, lo que confirma las posibilidades climáticas existentes para su crecimiento y desarrollo. En cuanto al suelo, catalogado como Ferralítico Rojo lixiviado, húmico nodular ferruginoso hidratado, arcilloso y profundo sobre calizas, con un pH ligeramente ácido de 6,2-6,4, concuerda con las exigencias edáficas que esta planta necesita en correspondencia con lo planteado por Libreros (1992), quien asegura que esta planta forrajera crece en suelos con diversa textura, desde franco-arenosos a arcillosos, bien drenados y prefiere los de mediana a alta fertilidad y con un rango de pH entre 5,5-7,0.

### 3.1.1 Composición bromatológica y determinación de la proporción de azúcares en las flores de *Gliricidia sepium* (proveniente del néctar).

Al analizar los resultados obtenidos en la tabla 3.2, se puede observar que el porcentaje de materia seca en las flores de *G. sepium* es bajo (8,69%). Ello pudo estar influenciado por los pétalos de la flor que constituyen un material suave y turgente. En cuanto a los valores de fibra bruta (32,57%), se considera que son elevados. Este valor de fibra pudo estar asociado en alguna medida porque en la muestra se incluyeron los sépalos de las flores y además por el alto porcentaje de lignina hallado en la flor producto de una hidrólisis ácida de (28,8%). Estos valores son superiores a los obtenidos por Gomes (2010), quien al determinar el promedio de lignina de Klason en diez leguminosas se encontró que este era de 22,7%. La fibra es el componente más importante de la pared celular de las plantas y constituye un elemento estructural. Esta fracción está integrada por celulosa, hemicelulosas, lignina y una serie de componentes menores ligados a ella, también digestibles (sílice, cutina y nitrógeno ligado entre otras).

El porcentaje de proteína bruta alcanzó un valor de 7,04%. De este valor se puede inferir que esta alta proteína es resultado del proceso fisiológico de circulación de sustancias orgánicas en la planta, ya que según Vázquez y Torres (2006), estas sustancias elaboradas por la fotosíntesis, que se lleva a cabo en las hojas, entre ellas los compuestos nitrogenados (ácido aspártico, treonina, serina, leucina, valina, fenilalanina, asparagina, glutamina y ácido  $\alpha$ -aminobutírico), pueden ser transportadas en dos direcciones: hacia las raíces o hacia otros centros de crecimiento activo, tales como el meristemo terminal del tallo, las flores o los frutos en desarrollo, en donde generalmente se encuentran en una concentración más elevada y en mayor número. Considerado por los autores anteriores como macro elemento o elemento abundante para las plantas, el contenido en  $\text{Ca}^{2+}$  en las fabáceas es mayor. Al ser las flores el primer paso en la formación del fruto es de esperar este relativamente alto valor de 0,99%, ya que este mineral es de suma importancia porque participa en la formación de las membranas celulares y las estructuras lipídicas. Además interviene en la organización de la cromatina o del huso acromático del aparato mitótico, es activador de ciertas enzimas como la fosfolipasa, la quinasa de la arginina, la trifosfatasa de la adenosina y la quinasa de la adenina. También interviene en la circulación de los azúcares, el metabolismo del nitrógeno (reducción de nitratos), la neutralización de los ácidos orgánicos y reduce la permeabilidad celular.

Tabla 3.2. Composición bromatológica de flores de *Gliricidia sepium*.

Procedencia	MS (%)	FB (%)	PB (%)	LK (%)	Ca (%)
Flores de <i>Gliricidia</i>	8.69	32.57	7,04	28,8	0.99

MS: materia seca, FB: fibra bruta, PB: proteína bruta, LK: lignina de Klason y Ca: calcio.

En la tabla 3.3 se puede observar los azúcares detectados en el extracto acuoso de flor de *Gliricidia sepium* a temperatura ambiente. Estos valores son referentes al contenido de azúcares presentes en el néctar de las flores maceradas. Los mayores picos se presentaron en los azúcares simples (glucosa y fructosa) con 4,82% y 10,36 % respectivamente, como se muestran en el cromatograma de la figura 3.1. La fructosa fue el monosacárido más abundante en el extracto y la sacarosa el disacárido más escaso, con valores de 1,73%.

Estos resultados concuerdan con estudios previos sobre el néctar de fabáceas nativas de Argentina realizados por Galetto y Bernardello (2003), quienes mostraron que la composición de azúcares está dominada principalmente por monosacáridos, mientras que la sacarosa está ausente o es muy escasa. La producción es continua durante toda la vida de la flor y el néctar no es reabsorbido (Cocucci *et al.*, 1992; Galetto *et al.*, 2000).

Tabla 3.3. Contenido de glucosa, fructosa y sacarosa presentes en el extracto acuoso de flor de *Gliricidia sepium* a temperatura ambiente.

Tiempo de Retención [min]	Área [mV.s]	Nombre del Compuesto	g/L	%
9,925	12,023	No identificados	-	-
13,817	58,588	No identificados	-	-
15,625	726,129	Sacarosa	14,46	1,73
19,042	1729,609	Glucosa	5,19	4,82
22,142	62,308	No identificados	-	-
25,325	12463,396	Fructosa	31,08	10,36

Además, en la actividad de recolección, la abeja, para efectuar una carga, visita de pocas a numerosas flores y cuando tiene posibilidad, elige nectáreos de elevada concentración azucarada y prefiere aquellos que contienen, unidos a la sacarosa, los dos monosacáridos: glucosa y fructosa (Apiexpa, 2000).

Se observó una coincidencia total en cuanto a los azúcares hallados en el néctar de la flor y el de la miel obtenida de *Melipona beecheii* como se mostrará más adelante, ya que el

néctar es la fuente principal de la que se origina la miel, es fundamental mencionar que este es segregado por órganos especializados de la planta, llamados nectarios. En la generalidad de las flores, el nectario forma un anillo en la base del ovario; en otras, los nectarios florales y el tejido glandular que secreta el néctar puede encontrarse en múltiples partes de la flor incluyendo el receptáculo, pétalos, sépalos, la base de los estambres y el pistilo (Montaldo; Esau, y Free, citados por Wulf, 1998).

Por otra parte, la producción de néctar varía conforme a las condiciones florales de cada planta, con las condiciones climáticas, la intensidad del brillo solar y en general con las condiciones edafoclimáticas de una zona en particular (Salamanca *et al.*, 1999).

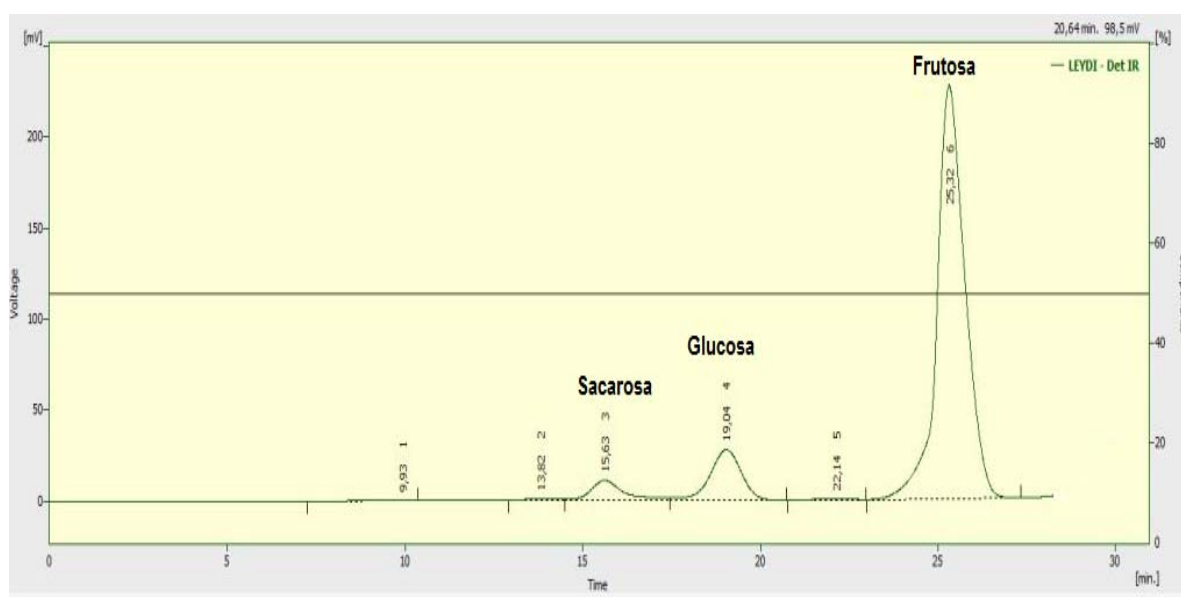


Figura 3.1. Cromatograma por HPLC de la sacarosa, la glucosa y la fructosa del extracto acuoso de flor de *Gliricidia sepium*.

### 3.1.2 Caracterización físico-química y organoléptica de la miel de *Melipona beecheii*.

La miel es el producto de la transformación del néctar de las flores o de exudaciones de otras partes vivas de las plantas, que después de ser operculado y transportado a la colmena en el estómago melífero de la abeja obrera, se almacena y madura en el panal para servir como alimento a las abejas y sus crías (FAO/OMS, 1990).

Las pruebas físicas y químicas que se le practican a las mieles guardan una estrecha relación con los parámetros de calidad de las mismas. Según Umaña (2006), el contenido de agua se considera un indicador de la pureza, del grado de madurez y de la estabilidad de la miel durante su almacenamiento, es decir, si presenta o no riesgos de descomponerse por

fermentación. La acidez libre es otro parámetro que puede indicar si la miel ha sufrido algún proceso fermentativo, por lo que se considera un criterio de frescura.

Evidentemente, si la Norma Cubana de Calidad de la Miel (NC, 2002), define como “miel de abeja” solo la producida por las abejas *Apis mellifera*, por una parte, sería incorrecto establecer comparaciones rígidas de valores de los índices de calidad con la miel de melipona, pero de otro lado, se tiene en la actualidad una propuesta de norma (Vit, 2000) que sirve de referencia hasta tanto exista la norma correspondiente. Ello permite, al menos, ofrecer una valoración a partir de un producto muy estudiado y de amplio consumo.

Si se comparan los resultados obtenidos (tabla 3.4) con la única propuesta de norma que se ha encontrado por Vit (2000) (tabla 3.5), los índices evaluados indican una excelente calidad de la muestra perteneciente a la colmena cuatro, al estar en correspondencia con los valores máximos de los índices permisibles para el género *Melipona*.

Tabla 3.4. Características físico-químicas y organolépticas de miel de *Melipona beecheii*.

Índices	Colmena4
Contenido de agua (g/ 100 g = %)	24,0
Acidez libre (meq /100 g)	35,0
pH	3,6
Sólidos solubles (g/100 g = %)	74,6
Análisis sensorial	
Aspecto	Ligero turbio
Olor	Característico
Sabor	Ácido
Textura	Viscosidad moderada
Color	Extra clara Ámbar (ELA)

Tabla 3.5. Propuesta de Norma de Calidad para mieles de melipónidos (Vit, 2000).

Géneros	Apis	Melipona	Scaptotrigona	Trigona
Índices				
Contenido de agua (g/100 g) Máx.	20,0	<b>30,0</b>	30,0	30,0
Azúcares reductores (g/100g) Mín.	65,0	<b>50,0</b>	50,0	50,0
Sacarosa (g/100 g) Máx.	5,0	<b>6,0</b>	2,0	6,0
Acidez libre (meq/100 g) Máx.	40,0	<b>70,0</b>	85,0	75,0
Cenizas (g/100 g) Máx.	0,5	<b>0,5</b>	0,5	0,5
Hidroximetilfurfural HMF (mg/kg) Máx.	40,0	<b>40,0</b>	20,0	40,0
Actividad diastasa (DN) Mín.	8,0	<b>3,0</b>	3,0	7,0

Estos resultados son muy similares a los obtenidos para las mieles matanceras evaluadas por Fonte (2007), a los resultados de Grajales *et al.* (2001), en México, y los de Díaz Mena *et al.* (2007), en Cuba. De todo ello se deduce que fue una miel cosechada con el grado de madurez adecuado para que no se produjera fermentación durante su almacenamiento (en recipientes cerrados y en lugares de baja humedad ambiental). Por otra parte, la acidez libre denota que la muestra al momento de su análisis no había sufrido degradación alguna por procesos fermentativos por lo que se puede considerar como una miel fresca, requisito clave para cualquier alimento destinado al consumo humano.

Los resultados del análisis sensorial están en correspondencia con la NC (2002), que plantea que la miel de abejas deberá presentarse como un líquido denso, viscoso y traslúcido o bien cristalizado y no deberá tener ningún sabor, aroma o color desagradables absorbidos de materias extrañas durante su procesamiento, envasado o almacenamiento.

Ulloa *et al.* (2010) plantean que existe una gran variedad de mieles con diferentes aromas, colores y sabores, dependiendo de su origen botánico. Los azúcares son los principales componentes del sabor. Generalmente la miel con un alto contenido de fructosa es más dulce que una miel con una alta concentración de glucosa. El aroma de la miel depende en gran medida de la cantidad de ácidos y aminoácidos. El color de la miel varía desde extra clara, pasando por tonos ámbar y llegando a ser casi negra; algunas veces con luminosidad amarilla típica, verdosa o de tono rojizo. El color está relacionado con el contenido de minerales, polen y compuesto fenólicos. Las mieles oscuras tienen un alto contenido de fenoles y consecuentemente una alta capacidad antioxidante.

Según Umaña (2006), el contenido de sacarosa en mieles maduras debe ser bajo en virtud de la enzima invertasa, la cual desdobra al disacárido en dos azúcares simples (glucosa y fructosa). Según la norma del Codex Alimentarius de Costa Rica el porcentaje de sacarosa no debe exceder el 5%. Sin embargo, Vit (2000) propone un máximo para mieles de melipona de 6%, valor muy próximo al porcentaje de sacarosa de la muestra obtenido en este estudio mediante Cromatografía Líquida de Eficiencia Elevada (HPLC) de 6,54% como se observa en la tabla 3.6.

En cuanto al contenido de azúcares simples (glucosa y fructosa), como se pueden observar en la tabla de referencia, están por debajo de 60% que es el valor máximo permisible por la

norma del Codex Alimentarius de Costa Rica. Los picos de sacarosa, glucosa y fructosa se observan bien definidos en el cromatograma de la figura 3.2.

Estos resultados indican que la muestra de miel de *Melipona beecheii* fue cosechada con una madurez óptima y que no fue adulterada por la adición de azúcares puros o jarabes que pudiesen alterar los valores normales de composición de carbohidratos de la miel.

Tabla 3.6. Contenido de glucosa, fructosa y sacarosa presentes en la miel de *Melipona beecheii* obtenida de la colmena 4.

Tiempo de Retención [min]	Área [mV.s]	Nombre del Compuesto	g/L	%
14,283	388,445	Sacarosa	0,76	6,54
17,492	1067,297	glucosa	3,21	29,30
20,367	60,024	No Identificados	-	-
27,767	1538,288	Fructosa	3,74	34,11

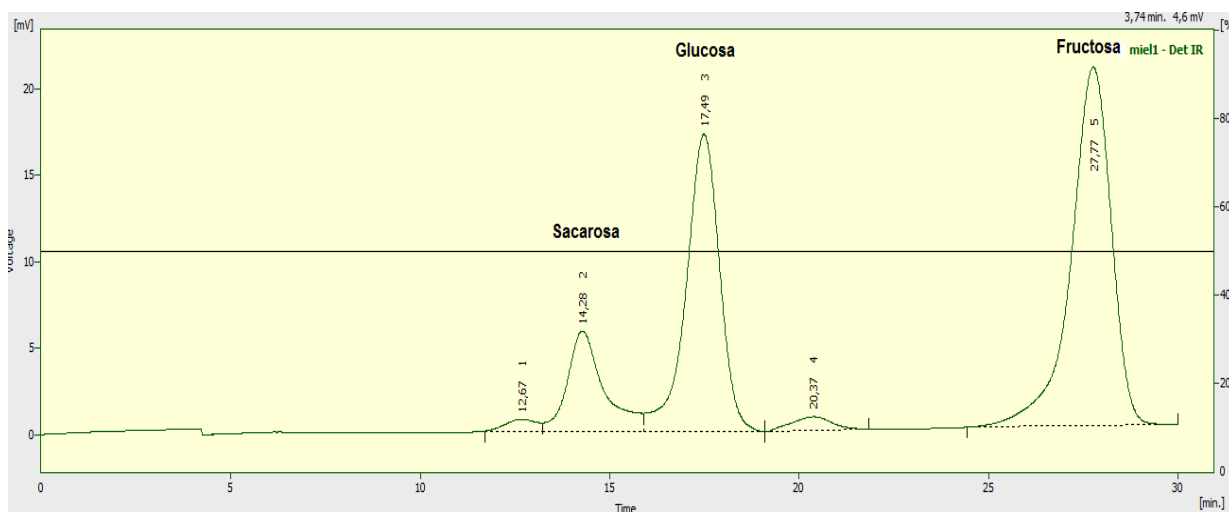


Figura 3.2. Cromatograma por HPLC de la sacarosa, la glucosa y la fructosa de la miel de *Melipona beecheii*.

### 3.1.2.1 Estudio Palinológico.

Alrededor de un 30% de la alimentación humana proviene de plantas polinizadas por abejas (Leal, 2010). La polinización es un servicio vital dentro de los ecosistemas que depende en gran medida de la simbiosis entre las especies, es decir, polinizador y

polinizado. Este vínculo se establece a través de la colecta del néctar (como fuente de carbohidratos) y el polen de las flores (como fuente de proteínas) que realizan las abejas para alimentarse y sobrevivir.

Los sépalos y pétalos son las estructuras más llamativas de las flores, brindan soporte y protección a las partes reproductivas internas; además sirven de atracción a los polinizadores. Las flores polinizadas por agentes abióticos en su mayoría son pequeñas y poco llamativas, mientras que las polinizadas por los bióticos tienen mecanismos de atracción para los animales (Arce *et al.*, 2001).

Para conocer y comprender la relación entre abejas y flores se utilizan las técnicas palinológicas, basadas en el reconocimiento en el ámbito morfológico del polen presente en la miel y polen colectados por las abejas, ello sirve de apoyo en la identificación de la flora apícola de la zona; lo que conlleva a un mejor aprovechamiento de las plantas útiles para las abejas, ya que de ellas depende la producción y calidad de la miel (Girón, 1996). La palinología también ha tenido aplicación en otras ramas como la Botánica, la Geología y Meteorología. La Melisopalinología es la rama de la Palinología que se encarga de estudiar los granos de polen contenidos en la miel, las cargas de polen y el alimento larval y contribuye a identificar los recursos florales (polen y néctar) explotados por las diferentes especies de abejas (Sánchez, 2001).

En la tabla 3.7 se indica el análisis palinológico en muestras de polen y miel procedentes de la colmena 4 donde se detectó la presencia de varios tipos polínicos incluyendo los de *Gliricidia sepium*. Por tal motivo, se determinó utilizar la miel de esta colmena en los ensayos de actividad antimicrobiana.

Tabla 3.7. Resumen del análisis palinológico en muestras de polen y miel de la colmena 4.

Nombre común	Nombre científico	Familia	P1	M1
Naranja	<i>Citrus sp.</i>	<i>Rutaceae</i>	-	X
Guayaba	<i>P. guajava</i> L.	<i>Myrtaceae</i>	X	X
Sensitiva	<i>M. pigra</i> L.	<i>Fabaceae</i>	X	X
Dormidera	<i>M. pudica</i> L.	<i>Fabaceae</i>	X	X
Almácigo	<i>B. simaruba</i> (L.)	<i>Burseraceae</i>	-	X
Ceiba	<i>C. pentandra</i> (L.)	<i>Bombacaceae</i>	X	X
Aroma amarilla	<i>Acacia farnesiana</i> (L.)	<i>Fabaceae</i>	X	-
Palma real	<i>Roystonea regia</i>	<i>Arecaceae</i>	-	-
Carolina	<i>Pseudobombax ellipticum</i> (Kunth)	<i>Bombacaceae</i>	-	-
Piñón	<i>Gliricidia sepium</i> (Jacq)	<i>Fabaceae</i>	X	X

\* Para el caso del polen la muestra fue rotulada como P1 y en el caso de la miel como M1.

### 3.2 Identificación cualitativa por Cromatografía en Capa Delgada (CCD) de algunos metabolitos secundarios.

Un gran porcentaje de los principios activos de las plantas están contenidos en los llamados productos naturales o metabolitos secundarios, que a pesar de que no parecen participar directamente en el crecimiento o desarrollo de las mismas; aportan al individuo que los produce una ventaja para responder a los estímulos del entorno, tales como: intervenir en las relaciones de competencia con otras plantas, actuando como agentes alelopáticos y contra invasiones de hongos, bacterias y virus (Harborne, 1993); relaciones de mutualismo en la atracción de polinizadores y dispersores de semillas (Ramos *et al.*, 1998); funciones defensivas causando toxicidad (Foo *et al.*, 1997); protección contra la radiación ultravioleta y la desecación (Ghasempour *et al.*, 1998); reserva de material nitrogenado (Poulton, 1990); y en la fijación del nitrógeno atmosférico, la formación de nódulos y la relación simbiótica en las raíces de las leguminosas (Stafford, 1997).

Desde el punto de vista botánico, las plantas rastreras contienen menores concentraciones de metabolitos secundarios que las plantas arbóreas. Esta diferenciación se ha hecho evidente en las especies de la familia *Leguminosae* (García, 2003).

Al realizar la Cromatografía en Capa Delgada (CCD) (tabla 3.8), se pudo constatar la presencia de metabolitos secundarios generales (terpenos, taninos condensados, flavonoides y saponinas), flavonoides, antraquinonas y saponinas. Sin embargo no se detectó la presencia de alcaloides.

En todas las cromatografías de forma general, las bandas se mostraron más intensas en los extractos metanólicos (SM) y etanólicos (SE) secos; mientras que en los extractos frescos (FM y FE) fueron casi imperceptibles.

Tabla 3.8. Resultado de la CCD realizada a los extractos metanólicos y etanólicos de flores frescas y secas de *Gliricidia sepium*.

Metabolitos Secundarios	Detector o revelador	Resultado
generales (terpenos, taninos condensados, flavonoides y saponinas)	Vanilina- Ácido Sulfúrico	+
flavonoides	UV 254nm y 366nm, NP/PEG	+
antraquinonas	UV 254nm , vapores de yodo	+
saponinas	UV 254nm, vanilina-Ácido sulfúrico	+
alcaloides	Dragendorff	-

En la figura 3.3 se muestran las bandas de color rosa y azules, indicador de presencia en general de metabolitos secundarios a una longitud de onda de 254nm. Entre ellos se encuentran los terpenos y los taninos condensados. Los primeros desempeñan una función importante en las plantas, ya que según estudios realizados (Panuwat *et al.*, 2003; Sikkema *et al.*, 1995; Helander *et al.*, 1998), se ha encontrado que la actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales es debida, en gran medida a la presencia de un tipo de compuestos denominados “terpenoides”. Siguiendo en orden de actividad los terpenoides que contienen grupos alcoholes, luego los que poseen aldehídos y por último los que tienen grupos cetónicos. Por ejemplo, es posible mencionar que el aceite esencial de *Lemon grass* (*Cytronella*) posee cantidades considerables de  $\alpha$ -citral,  $\beta$ -citral, citronelol, citronelal, linalool y geraniol los cuales han mostrado poseer actividad antimicrobiana ante *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. Otro ejemplo es el aceite esencial del *Melaleuca alternifolia* (té) el cual está compuesto, entre otros, por  $\alpha$ -terpineol, linalool y terpinen-4-ol y demuestra tener efectiva actividad antimicrobiana (Shane, 1973).

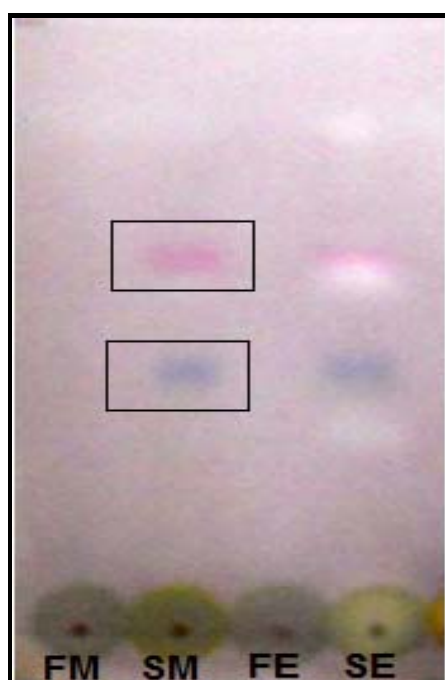


Figura 3.3. Cromatografía en Capa Delgada para detectar metabolitos secundarios (longitud de onda de 254nm). FM: extracto fresco metanólico, SM: extracto seco metanólico, FE: extracto fresco etanólico y SE: extracto seco etanólico.

Sin embargo, el mecanismo de acción específico de estos compuestos aún hoy no ha sido claramente caracterizado. No obstante, en la actualidad se propone como posible sitio de

acción la membrana celular donde los terpenoides surtirían un efecto, desencadenando una serie de procesos que podrían arribar a la muerte bacteriana (Shane, 1973; Ilkka, 1998).

Los taninos condensados en las plantas actúan como mecanismo de defensa ante el peligro de ser consumidas por los predadores. Estos actúan principalmente por dos mecanismos:

1. En la cavidad oral al masticar el animal la planta, se liberan los taninos; estos quedan expuestos a las proteínas y los carbohidratos y causan sensación de astringencia al formarse complejos entre ellos y las glicoproteínas de la saliva (Wong, 1973; McLeod, 1974; Reed *et al.*, 1982).
2. En el rumen y en el tracto gastrointestinal reducen la digestibilidad: se unen a enzimas y proteínas del alimento, de la flora y de las células epiteliales (Reed *et al.*, 1982; Liener, 1990). Las proteínas a las que se unen se vuelven insolubles, precipitan y de esta forma disminuyen las ganancias de peso y aumentan las pérdidas de producción.

Hervás *et al.* (1999b) realizaron estudios donde señalaron los efectos beneficiosos de los taninos condensados, ya que al unirse a las proteínas, disminuyen la degradación de las mismas en el rumen e incrementan la llegada de aminoácidos al intestino. Así mismo Wang *et al.* (1996) comprobaron en ovejas alimentadas con dietas de *Lotus corniculatus* que contenían estos taninos, una pérdida preabomasal de solo el 2% de los aminoácidos que contenía la ración, mientras que aumentaba la proporción de aminoácidos esenciales que escapaban a la digestión ruminal. Además, según Tanner *et al.* (1994), la presencia de taninos en la dieta, sobre todo en leguminosas, previene el timpanismo en los rumiantes por su unión con las proteínas solubles vegetales.

En la figura 3.4 A se observa la existencia de bandas y en la figura 3.4 B, una fluorescencia intensa en UV-366 nm de color amarillo, azul y verde, lo que denota la presencia de flavonoides en ambas longitudes de ondas.

Los flavonoides, según Tevini *et al.* (1991), son el grupo de los polifenoles de mayor importancia debido a la cantidad en que se presentan en las plantas. Una de las principales funciones que desempeñan es la de proporcionar coloraciones a flores y frutos, como las antocianinas que presentan coloraciones azul, púrpura, malva, rosa y rojo, constituyendo señales visuales para insectos polinizadores. Se acumulan principalmente en la epidermis de los pétalos y su biosíntesis frecuentemente coincide con el período de floración, declinando

una vez que la flor haya sido polinizada. Cada color y modelo de expresión del mismo están destinados a atraer una especie específica de polinizador. La biosíntesis de flavonoides en las plantas es una respuesta general para protegerse del daño contra la radiación ultravioleta es por eso que se acumulan mayormente en las células epidérmicas.

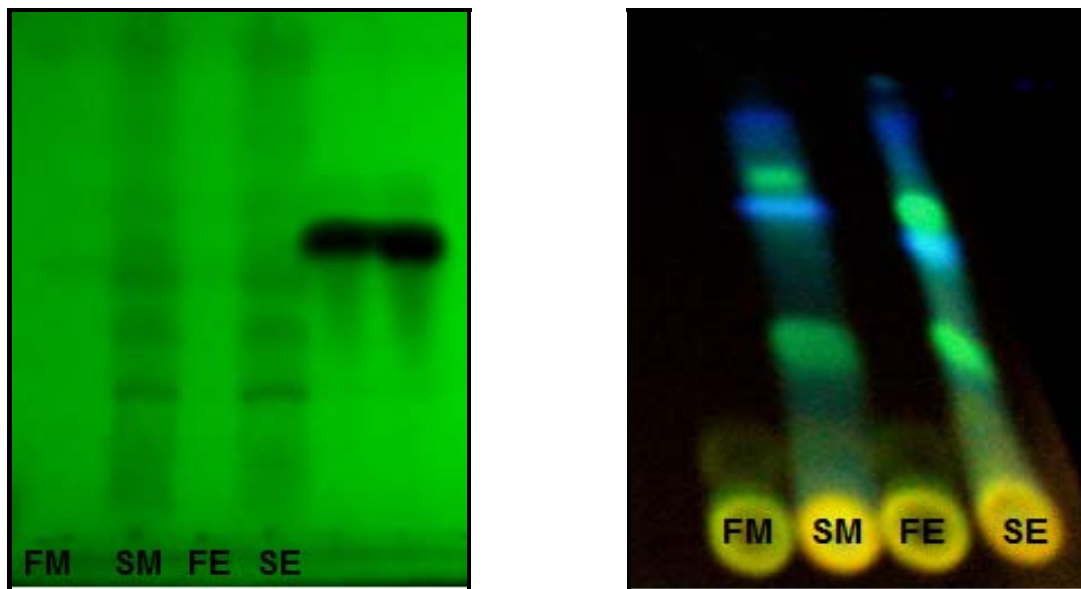


Figura 3.4. Cromatografía en Capa Delgada para detectar flavonoides. A: longitud de onda de 254nm, B: 366nm (NP/PEG). FM: extracto fresco metanólico, SM: extracto seco metanólico, FE: extracto fresco etanólico y SE: extracto seco etanólico.

Los flavonoides juegan un papel importante en la reproducción sexual de las plantas. Numerosas especies acumulan este metabolito (principalmente antiosaninas y flovonoles) en las anteras y el pistilo. En la primera etapa del desarrollo de las anteras la biosíntesis de flavonoides es activada en la capa de células que se encuentran dentro del saco embrionario, importante para el desarrollo de los granos de polen (tapetum) y durante la última etapa del desarrollo de la antera el contenido de la célula es liberado dentro del lóculo del polen, lo cual sugiere que los flavonoides desempeñan un papel fundamental dentro del desarrollo del mismo. Además intervienen en la interacción planta-patógeno, ya que en la naturaleza las plantas se encuentran expuestas constantemente a patógenos potenciales como bacterias y hongos (Koes *et al.*, 1994).

Flavonoides como quercetina y O-glicosídeos de quercetina presentan actividad antimicrobiana frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* (Fehlberg *et al.*, 2009).

En la figura 3.5 A se observó la existencia de bandas a una longitud de onda de 254 nm y en la figura 3.5 B, bandas de color amarillo utilizando como detector vapores de yodo, lo que denota en ambos casos la presencia de antraquinonas.

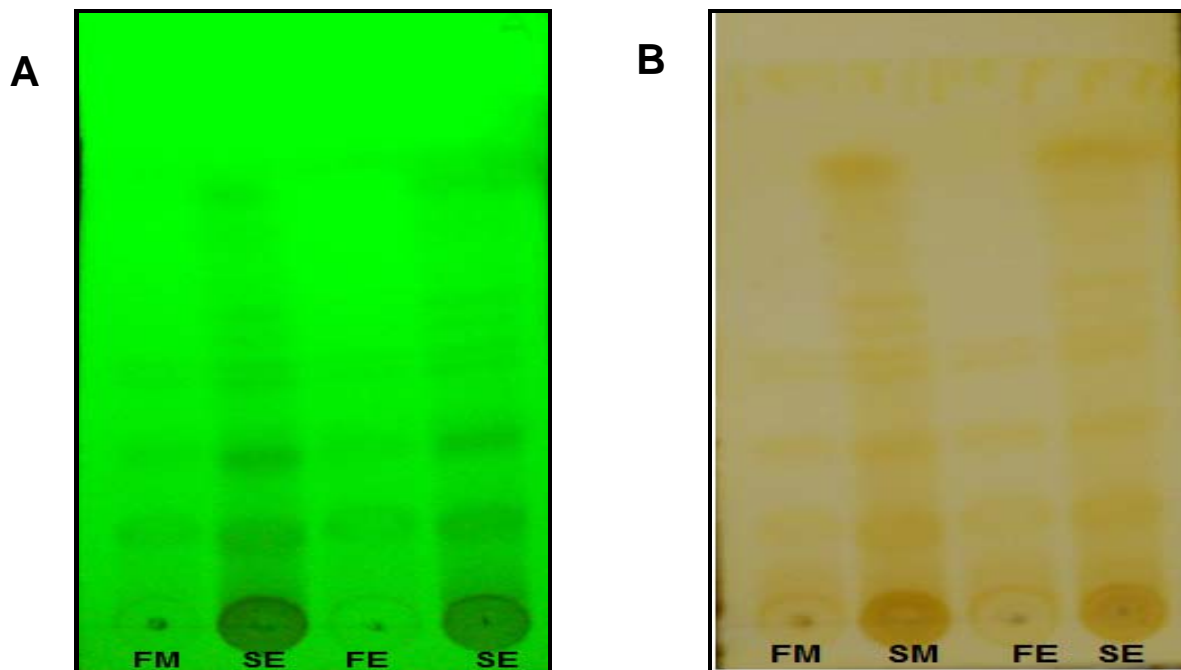


Figura.3.5. Cromatografía en Capa Delgada para detectar antraquinonas. A: a una longitud de onda de 254nm, B: mediante vapores de yodo. FM: extracto fresco metanólico, SM: extracto seco metanólico, FE: extracto fresco etanólico y SE: extracto seco etanólico.

Las quinonas son compuestos oxigenados que corresponde a la oxidación de compuestos aromáticos, y que se caracterizan por un agrupamiento. Por su color amarillo a violeta, contribuyen a la pigmentación de numerosos vegetales inferiores como algas, líquenes, y plantas superiores (Renteria *et al.*, 2005).

Según Albornoz (1980), la mayoría de las antraquinonas están hidroxiladas en C1 y C2 y con frecuencia están en forma de glucósidos, los que se hidrolizan durante el aislamiento. Los derivados antraquinónicos están presentes en los fármacos de acción purgante, actuando directamente sobre la musculatura lisa del colon dificultando la reabsorción de agua. Entre ellos se encuentra la Emodina (1, 3, 8-trihydroxy-6-methylantra-9,10-quinona).

Las antraquinonas tienen una gran importancia en la medicina humana debido a que estos metabolitos secundarios, según Mishra *et al.* (2010) y Kanokmedhakul *et al.* (2005), poseen actividad antimicrobiana, anticancerígena, antioxidante y antituberculosis, entre otras.

También, en la figura 3.6 A se observaron bandas a una longitud de onda de 254nm y en la figura 3.6 B, bandas de colores azules utilizando la Vanilina- Ácido Sulfúrico como detector, lo que denota la presencia de saponinas. Las saponinas constituyen un amplio grupo de heterósidos muy frecuentes en los vegetales. Se caracterizan por sus propiedades tenso-activas: se disuelven en agua formando disoluciones espumosas.

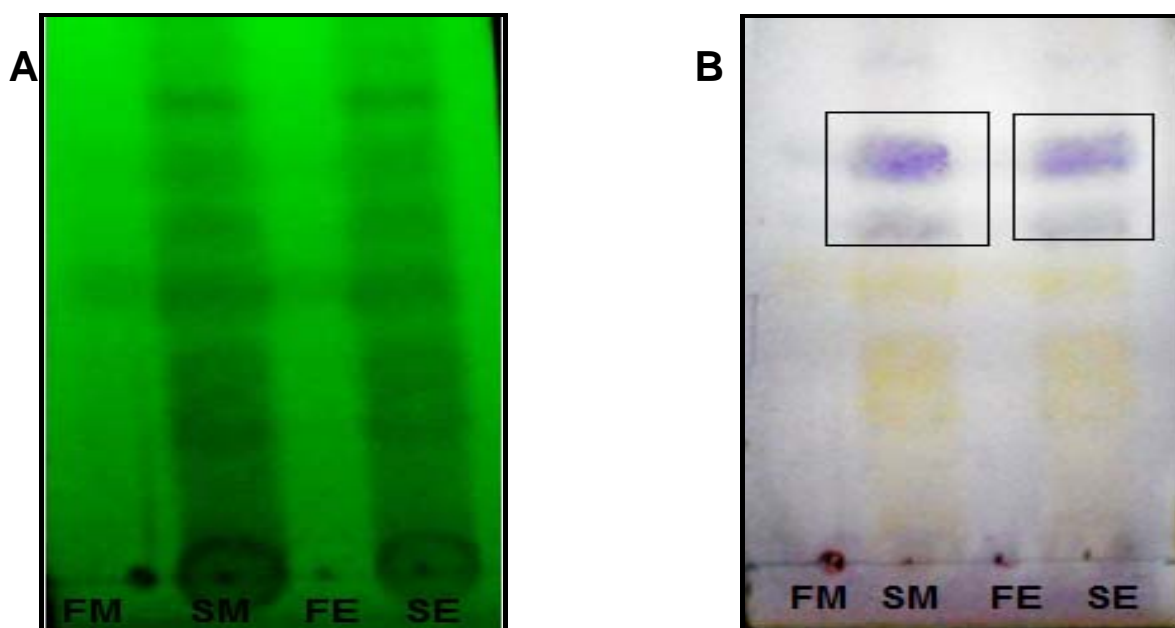


Figura.3.6 Cromatografía en Capa Delgada para detectar saponinas. A: a una longitud de onda de 254nm B: mediante la solución Vanilina- Ácido Sulfúrico (como detector) FM: extracto fresco metanólico, SM: extracto seco metanólico, FE: extracto fresco etanólico y SE: extracto seco etanólico.

Por regla general, las saponinas son hemolíticas. Esta propiedad se atribuye a su interacción con los esteroides de la membrana eritrocitaria. La interacción induce un aumento de la permeabilidad de la membrana y un intercambio de iones entre el sodio y el potasio (Bruneton, 2003). Estructuralmente, las saponinas se pueden clasificar en dos grupos según la naturaleza:

- Saponinas con genina esteroídica
- Saponinas con genina triterpénica

Por otra parte, en la figura 3.7 se observa la ausencia total de bandas, lo que indica que no se detectó en ningún extracto la presencia de alcaloides, coincidiendo con los resultados obtenidos por Jeeva *et al.* (2011), quienes al realizar la evaluación fitoquímica de extractos

metanólicos de flores de *Albizia lebbbeck* (*Fabaceae*), tampoco detectaron la presencia de este metabolito.



Figura. 3.7. Cromatografía en Capa Delgada para detectar alcaloides utilizando la solución de Dragendorff como detector. FM: extracto fresco metanólico, SM: extracto seco metanólico, FE: extracto fresco etanólico y SE: extracto seco etanólico.

Aunque no se hayan detectado alcaloides no es posible afirmar que no estén presentes, quizás a mayores concentraciones del extracto sean detectados o mediante otro tipo de método analítico como el de Cromatografía Gaseosa. Según Dierksmeier (2005), cuando en una identificación hay concordancia entre los resultados obtenidos por ambas técnicas, se puede confirmar la identidad del compuesto investigado o la ausencia del mismo en la muestra.

### **3.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los diferentes extractos de flor de *Gliricidia sepium* y de miel de *Melipona beecheii*.**

Si se parte del hecho que la concentración mínima inhibitoria (CMI) es definida como la concentración más baja de extracto que inhibe el crecimiento celular, es posible observar en la tabla 3.9, que los extractos metanólicos (fresco y seco) de flores de *Gliricidia sepium* mostraron bajos valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) entre 18,75 mg /mL y 37,5 mg /mL para los microorganismos evaluados. A excepción de *Staphylococcus aureus* (Anexo 1), que exhibió los mejores resultados de CMI (9,37 mg /mL) frente al extracto seco etanólico.

Se puede notar que tanto las bacterias Gram positivas, como las Gram negativas y la levadura resultaron sensibles a todos los tratamientos probados (extractos metanólicos, etanólicos y miel).

Tabla 3.9. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de extractos de flores de *Gliricidia sepium* y miel de *Melipona beecheii*.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) expresada en mg/mL					
Microorganismos	extracto metanólico		extracto etanólico		miel
	fresco	seco	fresco	seco	
Gram negativos					
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	18,75	18,75	18,75	18,75	2,34
<i>Escherichia coli</i>	37,5	37,5	18,75	18,75	4,69
Gram positivos					
<i>Staphylococcus aureus</i>	18,75	18,75	37,5	9,37	4,69
Levaduras					
<i>Candida albicans</i>	37,5	37,5	18,75	18,75	4,69

De forma general, al comparar los extractos metanólicos(fresco y seco) con los extractos etanólicos (fresco y seco), se puede observar que los segundos se comportaron mejor al exhibir valores más bajos de CMI en la mayoría de los microorganismos.

La levadura *Candida albicans* resultó tener la misma CMI en los cinco tratamientos evaluados que la bacteria Gram negativa *Escherichia coli*. En los extractos metanólicos (fresco y seco) se exhiben cifras de 37,5 mg/mL, en los extractos etanólicos (fresco y seco) de 18,75 mg/mL y en la miel de 4,69 mg/mL. Este es un resultado trascendente ya que según Hidalgo y Vázquez (2010), clínicamente se desea tener un medicamento (extracto o compuesto) con potencial para inhibir el crecimiento de varias cepas de *Candida*, porque varias especies de este género pueden provocar candidiasis; la cual, como se conoce, es la cuarta de las infecciones sistémicas más comunes en animales domésticos y en la mayoría de los casos es causada por *C. albicans* (50-60%), *C. glabrata* (15-20%), *C. parapsilosis* (10-20%), *C. tropicalis* (6-12%), y *C. krusei* (1-3%).

Los resultados obtenidos para los extractos de flores de *Gliricidia sepium* y para la miel, indican que las bacterias Gram negativas mostraron una CMI más baja, perteneciendo a este grupo la *Pseudomona aeruginosa*, la cual resultó ser la más susceptible de los cuatro microorganismos evaluados. Esta última presentó una CMI para los extractos metanólicos y etanólicos (frescos y secos) de 18,75 mg/mL (Anexo 2 y Anexo 3) y 2,34 mg/mL para la miel

(Anexo 4). Este resultado coincide con el hallado por Rojas *et al.* (2003) en estudios realizados con gossypitrina (principio activo aislado de flores de *Taliparitis elatum* conocida en Cuba por el nombre común de majagua), quienes demostraron que este compuesto puro presentaba mayor actividad frente a bacterias Gram negativas que sobre las Gram positivas.

Los resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales van a depender de las características específicas de los principios activos presentes en ellos y de su solubilidad en los solventes empleados para la extracción. Esto explica el hallazgo de extractos vegetales activos solamente frente a hongos o solo frente a bacterias, ya sean Gram positivas o Gram negativas; o frente a ambos grupos de bacterias cuando el extracto fue capaz de extraer una mezcla de componentes activos presentes en la planta (Rojas y Rodríguez, 2008).

Estos resultados se pueden atribuir a la presencia de metabolitos secundarios detectados mediante la Cromatografía en Capa Delgada (CCD), conforme se expuso en el acápite anterior (3.2) y que son sintetizados por las plantas para la defensa natural contra patógenos. Ello se debió principalmente a los flavonoides y a las antraquinonas, que según describen Hardman *et al.* (2005), Anaissi *et al.* (2003) y Sánchez *et al.* (2002) presentan propiedades antimicrobianas, sobre todo antifúngicas, actuando contra la pared celular, ya sea en la inhibición de la síntesis o penetrando en ella, o posiblemente debido a su acción antioxidante o su afinidad por las hormonas y/o proteínas celulares ya que actúa como inhibidor de procesos fundamentales para el hongo.

La miel de *Melipona beecheii* fue la que presentó las más bajas CMI, entre 2,34 mg/mL y 4,69 mg/mL. Es decir, todos los microorganismos evaluados resultaron más susceptibles a la miel que a los extractos metanólicos y etanólicos. Este resultado demuestra que al igual que en los extractos vegetales de la flor de *G. sepium* la actividad antimicrobiana de la miel frente a patógenos de origen bacteriano y fungoso, es atribuible en gran medida a los componentes fitoquímicos que estuvieron contenidos en las fuentes florales de donde las abejas obtuvieron el néctar, como son los flavonoides presentes en la miel (metabolitos secundarios de las plantas) y a la influencia del peróxido de hidrógeno (Ulloa *et al.*, 2010), ya que según Bogdanov (1997) y Vit y Jacob (2008) cuando la miel es diluida, como en este caso que se hicieron diluciones seriadas, ni la alta osmolaridad ni el pH bajo, son suficientes como agentes antimicrobianos.

### **3.4 Efecto de los extractos de flor de *Gliricidia sepium* y miel de *Melipona beecheii* sobre la inhibición del crecimiento microbiano.**

En la presente investigación, a pesar de que en todos los casos los valores de CMI estuvieron por debajo de 75 mg/mL (al 25%) se decidió estudiar esta concentración porque estaba en el rango intermedio de concentraciones bioactivas. Por esta razón las diluciones probadas fueron al 100% que representa una concentración de 300 mg/mL, al 75% que representa una concentración de 225 mg/mL y al 25% que representa una concentración de 75 mg/mL.

#### **3.4.1 Actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*.**

En la tabla 3.10 se muestra la actividad antimicrobiana de los extractos de flor de *Gliricidia sepium* y de miel de *Melipona beecheii* frente a la bacteria *Escherichia coli*, utilizando el método de perforaciones en agar y el disco-placa-cultivo en función del diámetro del halo de inhibición expresado en mm y del porcentaje del efecto inhibitorio respecto al control positivo (se eligió siempre el antibiótico que presentaba mayor diámetro del halo de inhibición). Como se puede observar en el método de perforaciones en agar, los mejores resultados en la dilución correspondiente al 100% y al 75% los presentó la miel con 18,10 y 17,40 mm respectivamente, lo que representa un 90,5% y 87,0% del efecto inhibitorio con respecto al control positivo seleccionado (ciprofloxacino), difiriendo significativamente del resto de los extractos en ambos casos, seguida por los extractos etanólicos (fresco y seco), que no presentaron diferencias significativas entre ellos, pero sí con el extracto fresco metanólico en el caso del 100% y con el extracto seco metanólico en el 75%. Para este método evaluado el mejor tratamiento desde el punto de vista estadístico fue la miel al 100% (Anexo 5), después de los controles positivos.

Sin embargo, en la dilución de 25% los valores más altos los alcanzó el extracto seco etanólico con 16,50 mm y 82,5%, no mostrando diferencias significativas con el extracto fresco etanólico ni con la miel, pero sí con los extractos metanólicos (frescos y secos), los cuales, a su vez, difirieron entre ellos.

Este resultado concuerda con los estudios realizados por Cáceres (1993, 1996, 1999), quien al evaluar la actividad antibacteriana de 9 extractos alcohólicos (metanol y etanol) de plantas nativas, incluida *G. sepium*, demostró que todas presentaban actividad antibacteriana tanto para cepas de bacterias Gram negativas como de Gram positivas.

Se puede apreciar que en todas las diluciones probadas la miel inhibió a *Escherichia coli*, que es una bacteria causante del 85 al 90% de las infecciones urinarias; así mismo, se le ha asociado a otras enfermedades como la neumonía, la meningitis en los neonatos y el choque inducido por endotoxinas.

Estos resultados son superiores a los diámetros de los halos de inhibición reportados por Catzin *et al.* (2008), quienes únicamente obtuvieron una inhibición inferior a 10 mm a una concentración del 100% en las mieles de *Melipona beecheii* y coincide con el resultado alcanzado por Enríquez *et al.* (2007) quienes reportaron actividad antimicrobiana de la miel incluso hasta una concentración de 5%. Además en investigaciones realizadas por Armas (2004), donde se recolectó miel procedente del departamento de Chiquimula en Guatemala y evaluó sus propiedades antibacterianas frente a *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, se detectó que la miel inhibió el crecimiento de estas bacterias.

Con anterioridad se han realizado estudios comprobando la actividad antimicrobiana de las mieles, en especial para *Apis mellifera* contra una amplia diversidad de patógenos (Molan 1992, 2002; Demera *et al.*, 2003; Estrada, 2005); sin embargo, en mieles de abejas sin aguijón, este tipo de investigaciones son reducidas. No obstante, algunos estudios han demostrado su efectividad (Demera, 2003).

Diversos componentes son responsables de la actividad antimicrobiana de la miel, entre ellos están la osmolaridad, la acidez, el peróxido de hidrógeno, el origen botánico de la miel, entre otros (Molan, 1992). Sin embargo, un componente importante son los fitoquímicos, sustancias que provienen de la floración visitada por la abeja para la colecta del néctar. Dentro de éste grupo están los flavonoides (que se identificaron en los extractos de flores de *G. sepium* a través de la Cromatografía en Capa Delgada (CCD) en el acápite 3.2), que presentan propiedades antioxidantes y antimicrobianas, y son reconocidos por inhibir un amplio rango de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Bogdanov, 1989).

En cuanto al método disco-placa-cultivo, a pesar de que la miel inhibió el crecimiento bacteriano en las tres diluciones probadas, los mejores resultados los alcanzaron los extractos frescos metanólico y etanólico ; ya que al 100% y al 25%, el papel protagonista fue del extracto fresco etanólico con 9,0 mm y 7,70 mm respectivamente y 93,8% y 80,2% del efecto inhibitorio con respecto al control positivo seleccionado (cefoxitín), presentando la primera dilución diferencias significativas con el resto de los extractos y la miel, menos con el extracto fresco metanólico, mientras que en la segunda difirió de todos los demás, siendo el extracto fresco etanólico al 100% (Anexo 6), el mejor tratamiento estadísticamente después de los controles positivos.

Tabla 3.10. Actividad antimicrobiana de los extractos de flor de *Gliricidia sepium* y la miel de *Melipona beecheii* frente a *Escherichia coli*.

Dilución	Método de perforaciones en agar									
	Extractos miel	EI	EFFM	EI	EFFE	EI	EFSM	EI	EFSE	EI
100%	18,10 <sup>b c</sup> ±0,143	90,5	17,00 <sup>cde</sup> ±0,143	85,0	17,60 <sup>cde</sup> ±0,143	88,0	17,30 <sup>cde</sup> ±0,143	86,5	17,60 <sup>b c d</sup> ±0,143	88,0
75%	17,40 <sup>cd</sup> ±0,143	87,0	16,00 <sup>det</sup> ±0,143	80,0	16,20 <sup>det</sup> ±0,143	81,0	15,00 <sup>tg</sup> ±0,143	75,0	16,30 <sup>cdet</sup> ±0,143	81,5
25%	16,30 <sup>cdet</sup> ±0,143	81,5	15,00 <sup>tg</sup> ±0,143	75,0	16,20 <sup>det</sup> ±0,143	81,0	15,60 <sup>det</sup> ±0,143	78,0	16,50 <sup>cdet</sup> ±0,143	82,5
Controles										
Control positivo 1	(Ciprofloxacino)				20,00 <sup>a</sup> ±0,229	100				
Control positivo 2	(Kanamicina)				19,00 <sup>b</sup> ±0,064					
Control negativo 1	0,00 <sup>g</sup> ±0,064	0								
Control negativo 2			0,00 <sup>g</sup> ±0,064	0			0,00 <sup>g</sup> ±0,064	0		
Control negativo 3					0,00 <sup>g</sup> ±0,064	0			0,00 <sup>g</sup> ±0,064	0
Dilución	Método de disco-placa pocillo									
	Extractos miel	EI	EFFM	EI	EFFE	EI	EFSM	EI	EFSE	EI
100%	8,30 <sup>cd</sup> ±0,178	86,5	8,70 <sup>bcd</sup> ±0,178	90,6	9,00 <sup>abc</sup> ±0,178	93,8	7,50 <sup>de</sup> ±0,178	78,1	7,70 <sup>cde</sup> ±0,178	80,2
75%	7,30 <sup>de</sup> ±0,178	76,0	7,70 <sup>cde</sup> ±0,178	80,2	7,50 <sup>de</sup> ±0,178	78,1	7,40 <sup>de</sup> ±0,178	77,1	7,60 <sup>cde</sup> ±0,178	79,2
25%	6,40 <sup>et</sup> ±0,178	66,7	6,70 <sup>e</sup> ±0,178	69,8	7,70 <sup>cde</sup> ±0,178	80,2	6,40 <sup>et</sup> ±0,178	66,7	6,70 <sup>e</sup> ±0,178	69,8
Controles										
Control positivo 1	(Cefoxitín)				9,60 <sup>ab</sup> ±0,80					
Control positivo 2	(Colestín Sulfate)				9,60 <sup>a</sup> ±0,80	100				
Control negativo1	0,00 <sup>i</sup> ±0,80	0								
Control negativo2			0,00 <sup>i</sup> ±0,80	0			0,00 <sup>i</sup> ±0,80	0		
Control negativo3					0,00 <sup>i</sup> ±0,80	0			0,00 <sup>i</sup> ±0,80	0

Miel (mm); EFFM (mm): extracto de flores fresco metanólico; EFFE (mm): extracto de flores fresco etanólico; EFSM (mm): extracto de flores seco metanólico ;EFSE (mm): extracto de flores seco etanólico ;EI (%): porcentaje del efecto inhibitorio respecto al control positivo; Control positivo 1 y 2 (mm); Control negativo1(mm): agua peptonada al 0,85%; Control negativo 2(mm):metanol al 70% ; Control negativo 3(mm):etanol al 70%.Letras diferentes indican diferencia significativa para  $p \leq 0,05$

A pesar de que en la literatura consultada no se encontraron resultados referentes a la utilización de los extractos etanólicos de flores de *G. sepium*, solo de extractos metanólicos; Akharaiyi *et al.* (2012) reportaron diámetros de inhibición de 16 mm en extractos etanólicos de hojas de este árbol. Los valores detectados fueron superiores a los obtenidos en esta investigación y pudieron estar influenciados por la concentración del extracto estudiada y por las cantidades de metabolitos secundarios presentes en las hojas.

Sin embargo la dilución al 75%, el extracto fresco metanólico exhibió los mejores resultados con 7,70 mm y un 80,2%, no mostrando diferencias significativas con el resto de los extractos, ni con la miel. Estos valores son inferiores a los obtenidos por Jeeva *et al.* (2011), quienes utilizando este mismo método, probaron la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de flores de cuatro plantas medicinales entre ellas *Albizia lebbbeck* (*Fabaceae*), reportaron diámetros de 11,1 mm. No obstante, fueron superiores a los obtenidos en las especies de *Thunbergia grandiflora* (6,3 mm) y *Cordia sebestena* (7,1 mm).

De forma general los porcentajes del efecto inhibitorio de los extractos y la miel con respecto al control positivo seleccionado fueron altos, en el orden de 66,7% al 93,8%, muy superiores a los obtenidos por Martínez *et al.* (1997), al evaluar la actividad antimicrobiana del extracto fluido (preparado en etanol al 40%) de las hojas del *Psidium guajava*, donde se evidenció una respuesta de inhibición en todos los casos de bacterias, menor que el 50% respecto al control positivo.

### **3.4.2 Actividad antimicrobiana frente a *Candida albicans*.**

En las tablas 3.11, se observa una coincidencia total entre los resultados alcanzados para los dos métodos aplicados, ya que en todas las diluciones probadas, la miel fue la que mostró los mejores resultados frente a la levadura *Candida albicans*. La miel al 100 % (Anexos 7 y 8), fue el mejor tratamiento para los dos métodos aplicados desde el punto de vista estadístico después de los controles positivos en los que se alcanzó el mayor valor. Para el método de perforaciones en agar al 100%, al 75% y al 25% el diámetro del halo de inhibición fue de 15,80 mm, 15,10 mm y 14,60 mm respectivamente con 72,1%, 68,9% y 65,6% del efecto inhibitorio con respecto al control positivo seleccionado (nistatina), no presentando diferencias significativas con el resto de los extractos.

Por otra parte, al utilizar el método de disco-placa-cultivo, utilizando la miel al 100% y al 25%, se detectaron halos de 10,60 mm para un 82,8% y 7,70 mm para un 60,2%, tampoco

presentaron diferencias significativas con el resto de los extractos. Sin embargo, la dilución al 75% mostró diámetros en el orden de 9,20 mm y 71,9%, no mostrando diferencias significativas con el resto de los extractos metanólicos y etanólicos (fresco y seco).

Según Armas (2004), una de las principales cualidades que se ha atribuido a la miel natural es su actividad antibacteriana, la cual se debe a su osmolaridad, relacionada con su contenido de agua, bajo pH, niveles de peróxido y presencia de inhibina (enzima de acción antibacterial). Pero aún cuando las propiedades antimicrobianas de la miel comúnmente se le han atribuido a su alta osmolaridad y a la acidez, esto es cierto cuando la miel no ha sido diluida (Gheldof y Engeseth, 2002) y por esta razón probablemente fue que se observó la inhibición del crecimiento de *C. albicans* a una concentración del 100% v/v.

Sin embargo, cuando la miel es diluida, ni la osmolaridad ni el pH son suficientes como agentes antimicrobianos (Bogdanov, 1997). Ahí es donde cobran importancia el peróxido de hidrógeno y los componentes fitoquímicos. El efecto inhibitorio de la miel sobre la levadura y la bacteria Gram positiva, aún en concentraciones finales de 25%, evidencia la presencia de otros factores responsables de sus propiedades antimicrobianas, fuera de su alto contenido de azúcares y pH ácido, como son los flavonoides provenientes de las flores de las plantas que las abejas visitan, en este caso de *G. sepium* como se demostró en el acápite 3.2.

#### **3.4.3 Actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*.**

Como se observa en la tabla 3.12, el extracto que presentó mayor actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* al 100% mediante el método de perforaciones en agar, fue el fresco etanólico con 25,20 mm y 54,8% del efecto inhibitorio con respecto al control positivo seleccionado (amoxicilina), difiriendo significativamente del resto de los extractos y de la miel. Ello coincide con lo planteado por Cáceres (1991) y Rahalison *et al.* (1993), quienes afirmaron que en *G. sepium*, los órganos con mayor actividad antimicrobiana eran la corteza, la flores y la raíz y que el mejor disolvente utilizado para elaborar los extractos por los resultados alcanzados era el etanol.

Por otra parte al 75% y al 25% los mejores resultados los alcanzó la miel con 25,0 mm para un 54,3% y 28,0 mm para un 60,9%, mostrando diferencias significativas con el resto de los extractos. Incluso la miel al 25% (Anexo 9), estadísticamente fue el mejor tratamiento utilizado al presentar los mayores diámetros de halos de inhibición después de los controles positivos..

Tabla 3.11. Actividad antimicrobiana de los extractos de flor de *Gliricidia sepium* y la miel de *Melipona beecheii* frente a *Candida albicans*

Dilución	Método de perforaciones en agar									
	Extractos miel	EI	EFFM	EI	EFFE	EI	EFSM	EI	EFSE	EI
100%	15,80 <sup>b</sup> ±0,413	72,1	15,50 <sup>bc</sup> ±0,413	70,8	15,60 <sup>bc</sup> ±0,413	71,2	15,50 <sup>bc</sup> ±0,413	70,8	15,60 <sup>bc</sup> ±0,413	71,2
75%	15,10 <sup>bc</sup> ±0,413	68,9	14,80 <sup>bc</sup> ±0,413	67,6	15,00 <sup>bc</sup> ±0,413	68,4	14,90 <sup>bc</sup> ±0,413	68,0	15,00 <sup>bc</sup> ±0,413	68,4
25%	14,60 <sup>bc</sup> ±0,413	65,6	14,40 <sup>c</sup> ±0,413	65,8	14,50 <sup>bc</sup> ±0,413	66,2	14,40 <sup>c</sup> ±0,413	65,8	14,50 <sup>c</sup> ±0,413	66,2
Controles										
Control positivo 1	(Nistatina) (Clotrimazol)				21,68 <sup>a</sup> ±0,660					
Control positivo 2					21,90 <sup>a</sup> ±0,185	100				
Control negativo 1	0,80 <sup>d</sup> ±0,185	0								
Control negativo 2			0,80 <sup>d</sup> ±0,185	0			0,80 <sup>d</sup> ±0,185	0		
Control negativo 3					0,80 <sup>d</sup> ±0,185	0			0,80 <sup>d</sup> ±0,185	0
Dilución	Método de disco-placa pocillo									
	Extractos miel	EI	EFFM	EI	EFFE	EI	EFSM	EI	EFSE	EI
100%	10,60 <sup>bc</sup> ±0,326	82,8	9,70 <sup>c</sup> ±0,326	75,8	10,20 <sup>bc</sup> ±0,326	79,7	9,70 <sup>c</sup> ±0,326	75,8	10,40 <sup>bc</sup> ±0,326	81,3
75%	9,20 <sup>cd</sup> ±0,326	71,9	9,10 <sup>cd</sup> ±0,326	71,1	9,10 <sup>cd</sup> ±0,326	71,1	9,10 <sup>cd</sup> ±0,326	71,1	9,10 <sup>cd</sup> ±0,326	71,1
25%	7,70 <sup>de</sup> ±0,326	60,2	7,40 <sup>de</sup> ±0,326	57,8	7,50 <sup>de</sup> ±0,326	58,6	7,40 <sup>de</sup> ±0,326	57,8	7,50 <sup>de</sup> ±0,326	58,6
Controles										
Control positivo 1	(Nistatina) (Clotrimazol)				12,70 <sup>ab</sup> ±0,163					
Control positivo 2					12,80 <sup>a</sup> ±0,146	100				
Control negativo1	0,64 <sup>e</sup> ±0,146	0								
Control negativo2			0,64 <sup>e</sup> ±0,146	0			0,64 <sup>e</sup> ±0,146	0		
Control negativo3					0,64 <sup>e</sup> ±0,146	0			0,64 <sup>e</sup> ±0,146	0

Miel (mm); EFFM (mm): extracto de flores fresco metanólico; EFFE (mm): extracto de flores fresco etanólico; EFSM (mm): extracto de flores seco metanólico ;EFSE (mm): extracto de flores seco etanólico ;EI (%): porcentaje del efecto inhibitorio respecto al control positivo; Control positivo 1 y 2 (mm); Control negativo1(mm): agua peptonada al 0,85%; Control negativo 2(mm):metanol al 70% ; Control negativo 3(mm):etanol al 70%.Letras diferentes indican diferencia significativa para  $p \leq 0,05$

Estos resultados son similares a los obtenidos Ruano (citado por Dardón, 2005), al evaluar la actividad bactericida de la miel elaborada por abejas sin aguijón. Las muestras fueron recolectadas en los departamentos de Chiquimula, San Marcos, Santa Rosa, Guatemala, Quiché y Petén. En esa investigación, se determinó que la miel procedente de los departamentos de Chiquimula, Guatemala, Santa Rosa y el Quiché era efectiva para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. También Enríquez *et al.* (2007), al realizar una evaluación de la actividad antibacteriana en la miel de 9 especies de abejas nativas de Guatemala demostraron que esta bacteria fue inhibida por la miel de *M. beecheii*.

Además, según Estrada *et al.* (2005), la inhibición de las mieles de las especies *M. beecheii* y de otras especies de abejas sin aguijón, en *S. aureus*, es de gran importancia, debido a que es uno de los microorganismos más frecuentemente aislado de heridas infectadas y muchas cepas han desarrollado resistencia a los antibióticos.

En cuanto al método de disco –placa –cultivo al 100% el extracto etanólico fresco (Anexo 10), fue el que mejores resultados mostró con diámetros de halo de inhibición de 25,0 mm para un 78,1% del efecto inhibitorio respecto al control positivo (ciprofloxacín), difiriendo significativamente del resto de los extractos y la miel. Es de resaltar que este fue el mejor tratamiento desde el punto de vista estadístico después del control positivo 2 (ciprofloxacín), ya que presentó diámetros mayores a los del control positivo 1 (cefoxitín) de 11,0 mm. Sin embargo al 75% el papel protagonista le perteneció al extracto seco metanólico con 9,50 mm para un 29,7%. Estos valores son muy superiores a los obtenidos por Akharaiyi *et al* (2012), quienes reportan diámetros de inhibición de 4,8 mm en extractos etanólicos de hojas de *G. sepium* frente a esta bacteria. No obstante al 25% ni la miel ni los extractos mostraron actividad antimicrobiana mediante este método.

Tabla 3.12. Actividad antimicrobiana de los extractos de flor de *Gliricidia sepium* y la miel de *Melipona beecheii* frente a *Staphylococcus aureus*

Dilución	Método de perforaciones en agar									
	Extractos miel	EI	EFFM	EI	EFFE	EI	EFSM	EI	EFSE	EI
100%	21,00 <sup>cde</sup> ±0,269	45,7	10,20 <sup>el</sup> ±0,269	22,2	25,20 <sup>bcd</sup> ±0,269	54,8	19,10 <sup>cde</sup> ±0,269	41,5	18,50 <sup>cde</sup> ±0,269	40,2
75%	25,00 <sup>bcd</sup> ±0,269	54,3	0,00 <sup>i</sup> ±0,269	0,0	0,00 <sup>i</sup> ±0,269	0,0	15,20 <sup>def</sup> ±0,269	33,0	17,30 <sup>cde</sup> ±0,269	37,6
25%	28,00 <sup>bc</sup> ±0,269	60,9	0,00 <sup>i</sup> ±0,269	0,0	0,00 <sup>i</sup> ±0,269	0,0	15,20 <sup>def</sup> ±0,269	33,0	14,70 <sup>def</sup> ±0,269	32,0
Controles										
Control positivo 1	(Amoxicilina)				46,00 <sup>a</sup> ±0,430	100				
Control positivo 2	(Cefalexina)				37,00 <sup>b</sup> ±0,122					
Control negativo 1	0,00 <sup>i</sup> ±0,120	0								
Control negativo 2			0,00 <sup>i</sup> ±0,120	0			0,00 <sup>i</sup> ±0,120	0		
Control negativo 3					0,00 <sup>i</sup> ±0,120	0			0,00 <sup>i</sup> ±0,120	0
Dilución	Método de disco-placa pocillo									
	Extractos miel	EI	EFFM	EI	EFFE	EI	EFSM	EI	EFSE	EI
100%	10,60 <sup>b</sup> ±0,360	33,1	0,00 <sup>c</sup> ±0,360	0,0	25,00 <sup>ab</sup> ±0,360	78,1	0,00 <sup>c</sup> ±0,360	0,0	10,50 <sup>b</sup> ±0,360	32,8
75%	0,00 <sup>c</sup> ±0,360	0,0	0,00 <sup>b</sup> ±0,360	0,0	0,00 <sup>c</sup> ±0,360	0,0	9,50 <sup>c</sup> ±0,360	29,7	0,00 <sup>c</sup> ±0,360	0,0
25%	0,00 <sup>c</sup> ±0,360	0,0	0,00 <sup>c</sup> ±0,360	0,0	0,00 <sup>c</sup> ±0,360	0,0	0,00 <sup>c</sup> ±0,360	0,0	0,00 <sup>c</sup> ±0,360	0,0
Controles										
Control positivo 1	(Cefoxitín)				11,00 <sup>b</sup> ±0,161					
Control positivo 2	(Ciprofloxacín)				32,00 <sup>a</sup> ±0,161	100				
Control negativo1	0,00 <sup>c</sup> ±0,161	0								
Control negativo2			0,00 <sup>c</sup> ±0,161	0			0,00 <sup>c</sup> ±0,161	0		
Control negativo3					0,00 <sup>c</sup> ±0,161	0			0,00 <sup>c</sup> ±0,161	0

Miel (mm); EFFM (mm): extracto de flores fresco metanólico; EFFE (mm): extracto de flores fresco etanólico; EFSM (mm): extracto de flores seco metanólico ;EFSE (mm): extracto de flores seco etanólico ;EI (%): porcentaje del efecto inhibitorio respecto al control positivo; Control positivo 1 y 2 (mm); Control negativo1(mm): agua peptonada al 0,85%; Control negativo 2(mm):metanol al 70% ; Control negativo 3(mm):etanol al 70%.Letras diferentes indican diferencia significativa para  $p \leq 0,05$

#### 3.4.4 Actividad antimicrobiana frente a *Pseudomona aeruginosa*.

En la tabla 3.13 se observa una coincidencia total en términos de las diluciones al 100% y al 25% en ambos métodos, ya que los mejores resultados los alcanzó la miel en el primer caso y el extracto seco metanólico en el segundo caso.

En el Anexo 11, se muestra como la miel utilizando el método de perforaciones en agar frente a *Pseudomona aeruginosa*, exhibió los mayores valores, incluso con diámetros de halos iguales al control positivo 1 (ciprofloxacino) de 25,0 mm y 71,4% del efecto inhibitorio respecto al control positivo 2 (cefalexina). Con ello resultó ser el mejor tratamiento desde el punto de vista estadístico. Con esta misma dilución, para el método de disco-placa-cultivo, mostró halos de 15,0 mm (50,0%), difiriendo significativamente del resto de los extractos para ambos métodos.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Catzin *et al.* (2008), quienes solo obtuvieron inhibiciones en *P. aeruginosa* utilizando la miel de *M. beecheii* a una concentración de 100%, pero con diámetros promedio de halos de 13,83 mm, inferiores a los obtenidos en este experimento.

Para el método de perforaciones en agar al 75%, el extracto fresco etanólico mostró los mayores valores con halos de 22,0 mm (62,9%) y para el método disco-placa-cultivo, el extracto seco etanólico fue el de mejor comportamiento con halos de 15,0 mm (50,0%), difiriendo estadísticamente de los extractos secos metanólicos y etanólicos en el primer caso y del extracto etanólico fresco en el segundo. Mientras que al 25% el mayor efecto antimicrobiano lo alcanzó el extracto seco metanólico (Anexo 12), con halos de 20,0 mm (57,1%) muy próximos a los obtenidos por Joji y Beena (2010), quienes al enfrentar extractos metanólicos de flores de *G. sepium* ante la bacteria *P. aeruginosa*, obtuvieron diámetros de halos de inhibición de 24,0 mm. Para el método de disco-placa-cultivo al 25%, el extracto seco metanólico también resultó ser el mejor tratamiento después de los controles positivos, con 17,0 mm (56,7%), valores muy cercanos a los diámetros de inhibición de 16 mm en extractos metanólicos de hojas de este árbol (Akharaiyi *et al.*, 2012), difiriendo significativamente del resto de los extractos y de la miel.

Tabla 3.13. Actividad antimicrobiana de los extractos de flor de *Gliricidia sepium* y la miel de *Melipona beecheii* frente a *Pseudomona aeruginosa*.

Dilución	Método de perforaciones en agar									
	Extractos miel	EI	EFFM	EI	EFFE	EI	EFSM	EI	EFSE	EI
100%	25,00 <sup>abc</sup> ±0,110	71,4	15,00 <sup>de</sup> ±0,110	42,9	20,00 <sup>bcd</sup> ±0,110	57,1	0,00 <sup>e</sup> ±0,110	0,0	0,00 <sup>e</sup> ±0,110	0,0
75%	0,00 <sup>e</sup> ±0,110	0,0	0,00 <sup>e</sup> ±0,110	0,0	22,00 <sup>bcd</sup> ±0,110	62,9	18,00 <sup>de</sup> ±0,110	51,4	15,00 <sup>de</sup> ±0,110	42,9
25%	0,00 <sup>e</sup> ±0,110	0,0	0,00 <sup>e</sup> ±0,110	0,0	15,00 <sup>de</sup> ±0,110	42,9	20,00 <sup>bcd</sup> ±0,110	57,1	15,00 <sup>de</sup> ±0,110	42,9
Controles										
Control positivo 1	(Ciprofloxacino)				25,00 <sup>ab</sup> ±0,176					
Control positivo 2	(Cefalexina)				35,00 <sup>a</sup> ±0,049	100				
Control negativo 1	0,00 <sup>e</sup> ±0,049	0								
Control negativo 2			0,00 <sup>e</sup> ±0,049	0			0,00 <sup>e</sup> ±0,049	0		
Control negativo 3					0,00 <sup>e</sup> ±0,049	0			0,00 <sup>e</sup> ±0,049	0
Dilución	Método de disco-placa pocillo									
	Extractos miel	EI	EFFM	EI	EFFE	EI	EFSM	EI	EFSE	EI
100%	15,00 <sup>bc</sup> ±0,046	50,0	0,00 <sup>d</sup> ±0,046	0,0	0,00 <sup>d</sup> ±0,046	0,0	13,00 <sup>c</sup> ±0,046	43,3	0,00 <sup>d</sup> ±0,046	0,0
75%	0,00 <sup>d</sup> ±0,046	0,0	0,00 <sup>d</sup> ±0,046	0,0	12,00 <sup>c</sup> ±0,046	40,0	0,00 <sup>d</sup> ±0,046	0,0	15,00 <sup>bc</sup> ±0,046	50,0
25%	0,00 <sup>d</sup> ±0,046	0,0	0,00 <sup>d</sup> ±0,046	0,0	0,00 <sup>d</sup> ±0,046	0,0	17,00 <sup>bc</sup> ±0,046	56,7	10,00 <sup>cd</sup> ±0,046	33,3
Controles										
Control positivo 1	(Cefoxitín)				18,00 <sup>b</sup> ±0,021					
Control positivo 2	(Ciprofloxacín)				30,00 <sup>a</sup> ±0,021	100				
Control negativo1	0,00 <sup>d</sup> ±0,021	0								
Control negativo2			0,00 <sup>d</sup> ±0,021	0			0,00 <sup>d</sup> ±0,021	0		
Control negativo3					0,00 <sup>d</sup> ±0,021	0			0,00 <sup>d</sup> ±0,021	0

Miel (mm); EFFM (mm): extracto de flores fresco metanólico; EFFE (mm): extracto de flores fresco etanólico; EFSM (mm): extracto de flores seco metanólico ;EFSE (mm): extracto de flores seco etanólico ;EI (%): porcentaje del efecto inhibitorio respecto al control positivo; Control positivo 1 y 2 (mm); Control negativo1(mm): agua peptonada al 0,85%; Control negativo 2(mm):metanol al 70% ; Control negativo 3(mm):etanol al 70%.Letras diferentes indican diferencia significativa para  $p \leq 0,05$

### 3.4.5 Síntesis de la actividad antimicrobiana frente a los cuatro microorganismos evaluados.

En la tabla 3.14 se muestra un resumen de los tratamientos que presentaron los mejores resultados de la actividad antimicrobiana por microorganismo para los dos métodos utilizados. Es importante señalar que para el método de perforaciones en agar, en tres de los cuatro microorganismos evaluados la miel en la dilución de 100% fue la que tuvo mayor efecto inhibitorio; siendo *Staphylococcus aureus* la bacteria más susceptible a la miel dentro del grupo, mostrando halos de inhibición de 28,0 mm, incluso en las dilución al 25%.

Los resultados alcanzados reafirman el gran valor medicinal que posee la miel de *M. beecheii* por sus efectos terapéuticos demostrados, además del valor nutritivo que se le atribuye comúnmente al ser un rico suplemento alimenticio por toda la gama de nutrientes que aporta al organismo que la consuma.

Tabla 3.14. Resumen de los tratamientos que mostraron mejores resultados de actividad antimicrobiana por microorganismo.

Microorganismos	Método de perforaciones en agar			Método de disco-placa-cultivo		
	Dilución (%)			Dilución (%)		
	100	75	25	100	75	25
<b>Gram negativos</b>						
<i>E.coli</i>	18,10●	-	-	9,00*	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	25,00●	-	-	-	-	17,00◆
<b>Gram positivos</b>						
<i>S. aureus</i>	-	-	28,00●	25,00*	-	-
<b>Levaduras</b>						
<i>C. albicans</i>	15,80●	-	-	10,60●	-	-

●: miel (mm) ; \*:extracto etanólico fresco (mm);◆:extracto metanólico seco ( mm).

Es válido resaltar que en el método de disco-placa-cultivo, la miel al 100 % fue efectiva únicamente frente a *Candida albicans*, ya que *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* mostraron susceptibilidad ante el extracto fresco etanólico en esta misma dilución, y que en los dos métodos evaluados, *S. aureus* fue la bacteria que mostró los mayores halos de inhibición. Siendo la bacteria más sensible dentro del grupo tanto a la miel en el primer método como al extracto fresco etanólico.

Estos resultados coinciden con lo planteado por Krolicka *et al.* (2008) y Chouna *et al.* (2009), quienes informan que las bacterias Gram positivas son más susceptibles que las Gram negativas, ya que la pared celular de las primeras es menos compleja y carecen de una filtración efectiva contra grandes moléculas, debido al tamaño de los poros en su envoltura celular, son menos selectivas. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, el mejor tratamiento para este mismo método fue el extracto metanólico seco en la dilución del 25%.

## CONCLUSIONES

1. De los cinco grupos de metabolitos secundarios detectados mediante la Cromatografía de Capa Delgada, los flavonoides y las antraquinonas, son los que pudisen estar involucrados en la actividad antimicrobiana frente a patógenos de origen bacteriano y fungoso, como describe la literatura.
2. La miel de *M. beecheii* resultó más efectiva que los extractos de flor de *G. sepium* frente a los cuatro patógenos evaluados, al presentar los más bajos valores de CMI. *Pseudomona aeruginosa* fue la bacteria más susceptible dentro del grupo de las Gram negativas.
3. En el método de perforaciones en agar, la miel en la dilución al 100% tuvo mayor efecto inhibitorio en tres de los cuatro microorganismos evaluados.
4. *Staphylococcus aureus* fue la bacteria más susceptible a la miel al mostrar los mayores halos de inhibición al 25% y en el método de disco-placa-cultivo lo fue al extracto fresco etanólico al 100%.
5. En el método de disco-placa-cultivo la miel al 100% fue efectiva únicamente frente a *Candida albicans*, mientras que *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* mostraron mayor susceptibilidad ante el extracto fresco etanólico en esta misma dilución.
6. Los resultados confirman el alto valor medicinal que posee la miel de *M. beecheii* por sus efectos antimicrobianos.

## RECOMENDACIONES

- 1- Ampliar el espectro de extractos a utilizar.
- 2- Extender los resultados a bioensayos con animales *in vivo*.
- 3- Evaluar las propiedades antibióticas de los propóleos extraídos de las colmenas de *Melipona beecheii* *in vitro* e *in vivo*.
- 4- Realizar nuevas investigaciones antibacterianas y antifúngicas sobre extractos de flores de otras especies forrajeras con posibles propiedades medicinales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Academia de Ciencias de Cuba.1989.Nuevo Atlas Nacional de Cuba. Instituto Cubano de Geodesia y Cartografía. La Habana, Cuba. p. 41
2. Adam, T. M. & Telcke, M.1975. Die werkung liviger umiceltakto renant die leistoren and die leistung der scwein feedsuffa. 50:23
3. Akharaiyi, F.C.; Boboye, B. & Adetuyi, F.C. 2012. Antibacterial, phytochemical and antioxidant activities of the leaf extracts of *Gliricidia sepium* and *Spathodea campanulata*. *World Applied Sciences Journal*. 16 (4): 523
4. Albornoz, A. 1980. Productos naturales. Sustancias y drogas extraídas de plantas. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.p.340
5. Aldama A, E. & Frias Marisela. 1986. Dosimetría. Centro Universitario de Pinar del Río. p. 14
6. Álvarez, A. *et al.* 2007. Influencia del método de secado y el tiempo de almacenamiento en estante de las hojas de *E. minutifolium* Griseb sobre la actividad citotóxica y antiherpética tipo 1. *Rev. cub. de Química*. XIX (1):33
7. Álvarez, P.A. & Varona, J.C. 1988. Silvicultura. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba. p. 152
8. Anaissi, E.J.; McGinnis, M.R. & Pfaller, M. A. 2003. Clinical Mycology. Churchill Livingstgone. USA. 608 p
9. ANON. 1994. El momento de los vivos. *PRODELESTE*. 23:11.
10. Anónimo.S.A. Conceptos de Fitoterapia. Laboratorio de Farmacodinamia y Fitofarmacología.Chile.<http://farmafitolab.med.uchile.cl/fitofarmacologia/fitoterapia.html> 20020417
11. AOAC. 1990. Official methods of analysis.11<sup>th</sup> ed. Association of Official Agricultural Chemistry. Washington, D.C
12. APIEXPA. 2000. Exportadora de productos apícolas. [Disponible en: <http://www.cepri.cl/apiexpa>]. (22. jul. 2000)
13. Arce, H.; Sánchez, L. & Slaa, R. 2001. Árboles melíferos nativos de mesoamérica.1a.ed. UNA – CINAT – PRAM - UU. Herbario Juvenal. Heredia, Costa Rica. 207 p
14. Arguayo, G.S. 2002. Insecticidas Vegetales, Facultad de Agronomía. Universidad de Concepción, Internet. Chillán, Chile.

15. Armas G. 2004. Determinación de susceptibilidad de la miel de abeja frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella.sp*, Programa de Experiencias Docentes con la comunidad, Universidad del San Carlos de Guatemala. 49 p
16. Barnum, D.A.; Glantz, P.J. & Moon, H. W. 1967. Colibacillosis. Ciba Veterinary Monograph Series/two. Summit.
17. Barrance, A. *et al.* 2003. Árboles de Centroamérica. Manual para Extensionistas. OFI/CATIE. 554 p
18. Barreto, Adelaida. 1990. Botánica de las leguminosas. Instituto de Ecología y Sistemática. La Habana, Cuba. 39 p
19. Berger, I. *et al.* 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections: II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. *J. Ethnopharmacol.* 62 (2): 107
20. Bjorland, J.; Sunde, M. & Steinar, W. 2001. Plasmid-Borne SMR gene causes resistance to quaternary ammonium compounds in bovine *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology.* 39:3999
21. Blood, D.C. & Henderson, J.A. 1969. Medicina veterinaria. 3a. ed. Interamericana. México, D.F. p 141
22. Bogdanov, S. 1997. Antibacterial substances in honey. Swiss Bee Research Center. [Disponible en: <http://www.apis.admin.ch/english/pdf/BeeProducts/ntibacterialInternet.>](30. jul. 2011)
23. Bogdanov, S. 1989. Determination of pinocembrin in honey using HPLC.J. *Apic. Res.* 28:55
24. Bruneton, J. 2003. Farmacognosia, fitoquímica y plantas medicinales. Segunda Edición. Editorial ACRIBIA S.A. España.p.44
25. Cáceres, A. 1996. Plantas de uso medicinal en. Editorial Universitaria. Guatemala. p.160
26. Cáceres, A. 1999. Manual de procedimientos del proyecto biodiversidad tropical centroamericana. OEA. p. 9
27. Cáceres, A. *et al.* 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimycotic activity of 44 plants extracts. *Journal of Ethnopharmacology.* 31:263

28. Cáceres, A. *et al.* 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders: Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 38:31
29. Cáceres, A. *et al.* 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. *J. Ethnopharmacol.* 40 (3): 207.
30. Cannell, J. P. 1998. Natural products isolation. Human Press. New Jersey, USA. 473 p
31. Carmona, R.; López, O.; González, M.L. & Muñoz, A. 2006. Optimización del proceso de obtención del extracto acuoso de *C. officinalis*. *Rev. cub. Plant med.* 11 (3-4):15
32. Carter, G. R. 1979. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology, Editorial. Thomas, 3ra. ed. Michigan, USA. p.40
33. CATIE. 1991. Madreado, especie de árbol de uso múltiple en América Central. Guía Silvicultural. Informe técnico 180. Turrialba, Costa Rica. 79 p
34. Catzin, Gloria.; Delgado, A. & Medina, L. 2008. Evaluación de la actividad antibacteriana de la miel de *Melipona beecheii* y *Scaptotrigona pectoralis* de Yucatán, Mexico. En: Memorias V Congreso Mesoamericano sobre abejas sin aguijón. Mérida, México. 55 p
35. Chacón, C. 1996. Mata ratón (*Gliricidia sepium*): Manejo y utilización por bovinos. II Seminario Manejo y Utilización de Pastos y Forrajes en Sistemas de Producción Animal. Eds. R. Tejos, C. Zambrano, M. Camargo y L. Mancilla. Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales "Ezequiel Zamora". Barinas, Venezuela. p. 40
36. Chife, C. 2005. Garantía y control de calidad de materias primas vegetales para fines farmacéuticos. *Rev. Lab Ciencia* 4:6-8, 24-26. [Disponible en: [http://: www.noticias-tecnicas.com](http://www.noticias-tecnicas.com)]. (20. agost.2011)
37. Chouna J. P. *et al.* 2009. Antibacterial endiandric acid derivatives from *Beilschmiedia anacardioides*. *Phytochemistry* , 70 (5) : 684
38. Cobbina, J.; Kolawole, G.O. & Atta-Krah, A.N. 1990. Leucaena and *Gliricidia* seed viability and germination as influenced by storage conditions. *Leucaena Research Reports*. 11:91
39. Cocucci, A.A.; Galetto, L. & Sersic, A. 1992. El síndrome floral de *Caesalpinia gilliesii* (Fabaceae- Caesalpinioideae). *Darwiniana*. 31(1-4):111
40. Codex Standard For Honey. Codex Stan 12-1981.Rev.2001.24<sup>th</sup> Session of the Codex Alimentarius Commission, p. 7

41. Costerton, J.W. 1980 *Pseudomonas aeruginosa* in nature and disease. *Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes and their treatment*. Ed. Sabath, Hans Huber Publishers, Bern, Switzerland. p. 15
42. Cucarella, C .*et al.* 2002. Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infection and Immunity*. 70:3180
43. Dardón, M. 2005. Análisis de susceptibilidad de la miel de abejas sin aguijón. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis de graduación. 44 p
44. Demera, J. & .Angert, E.2003. Comparison of the activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* L. from different phytogeographic regions of Costa Rica.En: Memorias III Seminario Mesoamericano de abejas sin aguijón. Tapachula, Chiapas, México. 48 p
45. Díaz Mena, D. *et al.* 2007. Estudio de las características físico-químicas, organolépticas y microbiológicas de la miel de *Melipona beecheii* de Cuba. II Congreso Cubano de Apicultura. La Habana.p.29
46. Dierksmeier, G. 2005. Métodos cromatográficos. Editorial Científico Técnica. Impresol Ediciones Ltda. Bogotá, Colombia. p.256
47. Douglas, L. *et al.*2000. Genomic typing of *Streptococcus uberis* isolates from cases of mastitis, in New Zealand dairy cows, using pulsed- $\Lambda$ eld gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*. 75:7
48. Elevitch, C. R. & Francis, J. K. 2006. *Gliricidia sepium* (gliricidia), ver. 2.1. In: Species profile for Pacific Island agroforestry. Ed C. R Elevitch. Permanent Agriculture Resources, Hawaii, U.S.A. [Disponible en:<http://www.traditionaltree.org>].(1. sept.2011)
49. Enríquez, E. & Aguilera, C.M. 2008.Miel de abejas nativas en Guatemala .USAC. Guatemala. p. 17
50. Enríquez, E.; Maldonado, C. & Dardón, M.J. 2007. Caracterización de la miel de abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) de Guatemala. En: Memorias V Congreso Mesoamericano sobre abejas sin aguijón.Mérida, México. 40 p
51. Estrada, H .;Gamboa, M.; Chaves, C. & Arias, L. 2005. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus níger*. Evaluación de su carga microbiológica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*.55 (2): 167

52. FAO/OMS. 1990. Norma Regional Europea para la miel.
53. Fehlberg, I.; Oliveira, R.A.; Guedes, M. L. S. & Cruz, F. G. 2009. Atividade antibacteriana de flavonóides e triterpenos de *Myrcia guianensis*. 32<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Fortaleza, CE, Brasil. p. 52
54. Fitzgerald, R.J. *et al.* 2001. Characterization of a Putative Pathogenicity Island from Bovine *Staphylococcus aureus* Encoding Multiple Superantigens. *Journal of Bacteriology*. 183:63
55. Fonte, Leydi. 2007. Las “abejas de la tierra” en zonas de las provincias occidentales de Cuba: las colmenas, la miel que producen y los “meliponicultores”. Trabajo de Diploma. Universidad Agraria de La Habana, Cuba. p. 77
56. Foo, L.Y.; Lu, Y.; McNabb, W.C.; Waghorn, G. & Ulyatt, M.J. 1997. Proanthocyanidins from *Lotus pedunculatus*. *Phytochemistry*. 45:1689
57. Fors, A.J. 1965. Maderas cubanas. INRA. La Habana, Cuba. p. 120
58. Galetto, L. & Bernardello, G. 2003. Nectar sugar composition in angiosperms from Chaco and Patagonia (Argentina): an animal visitor's matter? *Plant. Syst. and Evolut.* 238(1-4):69-86
59. Galetto, L. *et al.*, 2000. Reproductive biology of *Erythrina cristagalli* (Fabaceae). *Ann. of the Missouri Bot. Garden* 87:127-145
60. García, D.E. 2003. Efecto de los principales factores que influyen en la composición fitoquímica de *Morus alba* (Linn.). Tesis presentada en opción al título de Máster en Pastos y Forrajes. EEPF “Indio Hatuey”. Matanzas, Cuba. 98 p
61. García, J. 1993. La filtración y la centrifugación en la industria químico-farmacéutica. *Primer Curso Internacional*. Segunda Parte, p. 82-6, [Ciudad Habana, Cuba]
62. Gay, C. C. 1965. *Escherichia coli* and neonatal disease of calves. *Bacterial. Rev.* 29: 75
63. Ghasempour, H.R.; Anderson, E.M.; Gianello, R.D. & Gaff, D.F. 1998. Growth inhibitor effects on protoplasmic drought tolerance and protein synthesis in leaf cells of the resurrection grass *Sporobolus stapfianus*. In: Plant growth regulation. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. p.179
64. Gheldof, N. & Engeseth, N. Antioxidant capacity of honey from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *J Agric Food Chem.* 50: 3050

65. Girón V, M. 1996. Melitopalínología "Recolección de polen y néctar por *Apis Mellifera* en algunas especies de plantas silvestres y cultivadas del municipio de Salgar (Antioquía)". Litografía Luz. Calarcá, Quindío. Colombia. 83 p
66. Glover, N. 1989. Gliricidia: production and use. Nitrogen Fixing Tree Association. Waimalao, USA. 44 p
67. Gomes, Diany Iris. 2010. Avaliação do teor de lignina em forrages tropicais por diferentes métodos analíticos e sua associação com a degradação da fibra insolúvel. Viçosa. Minas Gerais-Brasil. 39 p
68. Grajales, J. *et al.* 2001. Características físicas, químicas y efecto microbiológico de mieles de meliponinos y *Apis mellifera* de la región Soconusco, Chiapas. Memorias II Seminario Mexicano sobre Abejas sin Aguijón. Mérida, Yucatán. México. 9-10 nov. /2001. pp. 61-66
69. Gross, W.B. 1972. Colibacillosis. En Diseases of poultry. Ed: M. S. Hofstad, Iowa State University Press. USA. p. 392
70. Gupta, M.P. 1995. Gliricidia sepium. En: 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas 1st edición, Bogotá. Colombia: [Presencia Ltda.]: 378
71. Gyles, C.L. 1972. Comments on the pathogenesis of the neonatal enteric colibacillosis of pigs. *J. Am. Vet. Med. Ass*, 160:582
72. Harborne, J. 1993. Introduction to ecological biochemistry. Academic Press, USA. 232 p
73. Hardalo, C. & Edberg, S.C. 1997. Pseudomonas aeruginosa: Assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.* 23: 47
74. Hardman S. *et al.* 2005. Disseminated Sporothrix schenckii in a patient with AIDS. *J of Infec*; 51:73
75. Helander, I. *et al.* 1998. Characterization of the Action of selected Essential Oil Components on Gram-negative Bacteria; *Journal Agricultural Food Chemistry*, 46, 3590
76. Herath, H.M. *et al.* 1998. Isoflavonoids and Pterocarpan from *Gliricidia sepium*. *Phytochemistry*, 47, 117
77. Hernández, A. *et al.* 2003. Nuevos aportes a la Clasificación genética de suelos en el ámbito nacional e internacional. Instituto de Suelos. Ministerio de la Agricultura. AGRINFOR. La Habana, Cuba. p 145
78. Hervás, G. *et al.* 1999. Efecto de la infusión diaria de quebracho en el rumen de ovejas sobre la degradación de la torta de soja protegida con taninos condensados. ITEA. Vol Etra, No. 20. Tomo II. VIII Jornadas sobre producción animal.

79. Hidalgo, J.A. & Vázquez, J. A. Candidiasis, emedicine from WebMD, 2008. [Disponible en]: <http://emedicine.medscape.com/article/213853-overview>. [consultado Sep 2010]
80. Ilkka, M. 1998. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3590
81. Jeeva, S.; Johnson, M.; Aparna, J. S. & Irudayaraj, V. 2011. Preliminary Phytochemical and Anti-Bacterial studies on flowers of selected medicinal plants. *Int. J. Med. Arom. Plants*. September, 1 (2): 107
82. Joji, R. & Beena, J. 2010. Evaluation of antibacterial activity of the bark, flower and leaf extracts of *Gliricidia sepium* from South India. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. 2 (3): 18
83. Jurd, L. & Manners, G.D. 1977. Isoflavene, isoflavan, and Flavonoid constituents of *Gliricidia sepium*. *J. Agric. Food Chem.* 25. 723
84. Kang, B.T. & Mulongoy, K. 1987. *Gliricidia sepium* as a source of green manure in an alley cropping system. In: *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp: management and improvement. Proceedings of a workshop held at CATIE. Turrialba, Costa Rica. Nitrogen Fixing Tree Association. Special publication 87-01. p. 44
85. Kanokmedhakul, K.; Kanokmedhakul, S. & Phatchana, R. 2005. Biological activity of Anthraquinones and Triterpenoids from *Prismatomeris fragrans*. *J Ethnopharmacol.* 100(3):284
86. Koes, R.E.; Quattrocchio, F. & Mol, J. 1994. The Flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *Bio Essays*. 16(2):123
87. Krolicka A. *et al.* 2008. Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in carnivorous plants grown in vitro by addition of elicitors. *Enzyme Microbial Technology*. 42(3):216
88. Labougle, J.M. & Zozaya, J.A. 1986. Historia de la Apicultura Mexicana. *Ciencia y Desarrollo* (CONACYT). 69 p. 321
89. Lammers, A. *et al.* 2000. Identification of *Staphylococcus aureus* genes expressed during growth in milk: a useful model for selection of genes important in bovine mastitis? *Microbiology*. 46:981
90. Leal, Ailyn. 2010. Estudio de *Melipona beecheii* Bennett en la provincia de Pinar del Río. Tesis de Doctorado. Universidad de Alicante – Universidad de Pinar del Río. Cuba. 88 p

91. Libreros, H.F. 1992. La explotación pecuaria en un contexto agroforestal: Alternativa para el desarrollo integral y sostenible de la ganadería del trópico. ICA, Palmira. Palmira, Valle, Colombia. p. 26.
92. Liener, I. E. 1990. Naturally occurring toxic factors in animal feedstuffs. In: Feedstuff Evaluation. Wiseman, J. and Cole, D.J.A Eds. Butterworths. London. United Kindong. p.377
93. López, O. *et al.* 2007. Obtención y escalado del extracto seco de *C. Officinalis* L. *Rev. Cub. de Química*. XIX (1) p. 71
94. López, O.; Muñoz, A.; Carmona, R.; Torres, L. & González, M. L. (2006). Influencia del uso de aditivos sobre el rendimiento del proceso de secado por aspersión del extracto acuoso de *C. Officinalis* L. *Rev. Cub. Plant Med.* 11 (1).p. 325
95. Machado-Sampaio, I.B. 2002. Estadística aplica a experimentação animal. Ed. FEPMVZ. Minas Gerais, Brazil. 265 p
96. Macola, S.; Llop, A.; Valdés-Dapeno, M. & Zuazo, J. L. 2001. [Microbiología y parasitología médicas]. Vol I. Habana: [Editorial Ciencias Médicas]. pp. 501-507
97. Manners, G. D. & Jurd, L. 1979 Additional flavonoids from *Gliricidia sepium*. *Phytochemistry*, 18: 1037-1042
98. Martínez, M. J.; Molina, N. & Boucourt, E. 1997. Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava*. (GUAYABA). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2(1): 12
99. Mc Leod, M.N. 1974. Plants tannins; their role in forage quality. *Nut. Abstr. Rev.* 44:803-815
100. Medinilla, B. 2001. Manual de Laboratorio de Fitoquímica. USAC. Guatemala p. 27
101. Middleton, J. R. *et al.* Influence of *Staphylococcus aureus* Strain-type on Mammary Quarter Milk Somatic Cell Count and N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase Activity in Cattle from eight dairies. *Journal dairy science*. 85:1133
102. Mishra, B.B. *et al.* 2010. A novel antifungal anthraquinone from seeds of *Aegle marmelos* Correa (family Rutaceae). *Fitoterapia*. 81(2):104
103. Molan, P. 1992. The antibacterial activity of honey, I. The nature of antibacterial activity. In The antibacterial activity of honey. International Bee Research Association (IBRA) United Kingdom. p 5
104. Molan, P. 2001. Why honey is effective as a medicine. I. Its use in modern medicine: Honey and healing, [Ed]: Pamela & R. Jones, IBRA United Kingdom p 1

105. Molan, P.C.2002. Authenticity in honey, in PR Ashurst & MJ Dennis [Ed.] Food authentication, Blackie Academic and Professional, London United Kingdom.
106. Mora, E. 1983. Introducción al estudio de la variabilidad fenotípica de madero negro (*Gliricidia sepium*).Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turialba, Costa Rica. p. 51
107. Morton, J.F. 1981. Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Springfield, Charles C. Thomas Publisher. p.1420
108. N.C.74-45:87. 1979. Miel de abejas. Especificaciones de calidad.Sust.NC 74-01:79 y 74-03:79. Vigente desde. 1979
109. Nogueira-Neto, P. 1997. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. [Ed]: Nogueirapis. São Paulo. Brazil
110. Oficina Nacional de Normalización. 2002. Norma Cubana. Miel de Abejas. Especificaciones. NC-371. 1era. ed. Oficina Nacional de Normalización. La Habana, Cuba
111. Otarola, A. 1995. Cercas vivas de Madero negro: práctica agroforestal para sitios con estación seca marcada. *Agroforestería en las Américas*. 2:24
112. Pace, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*. 276: 139
113. Panuwat, S.; Joseph, M.; Kees, S. & Stephen, W. 2003. Antimicrobial Properties of Basil and Its Possible Application in Food Packaging. *J. Agric. Food Chem*. 51: 3197
114. Parrotta, J.A. 1992. *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp. *Gliricidia*, mother of cocoa. Southern Forest Experiment Station. New Orleans, LA: U.S.A. Department of Agriculture. p 7
115. Pennington, T. D. & Sarukhán, J. 2005. Árboles tropicales de México. Manual para identificación de las principales especies. Universidad Nacional Autónoma de México, Fondo de Cultura Económica. México .D.F. p. 522
116. Perez Dominguez, C. 1989. Postes vivos: Cercas productivas. CIDA. La Habana, Cuba. p. 20
117. Pérez, A.; Roche. R. & Hernández, A. 1996. Factores que influyen en la producción de semillas de *Gliricidia sepium*. Resultados preliminares. Resúmenes. II Taller Internacional "Los Arboles en los sistemas de producción ganadera". EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. p. 43

118. Pérez, R. 1995. *Gliricidia sepium*: Piñón cubano o florido, bienvestido o matarratón. Carta Agropecuaria Azucarera. Departamento de Producción Agropecuaria. La Habana. Cuba.p 2
119. Pezo, D.; Romero, F. & Kass, M. 1993. Manejo agronómico de leguminosas arbóreas para la producción de forraje de calidad: Algunas experiencias con *Erythrina* spp y *Gliricidia sepium*. III Curso de Producción de Pastos y Forrajes. Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. p. 2
120. Pharmacopea. 2007. 565 Botanical extracts. USP 30.
121. Polanco, X. 2003. Calidad en laproducción y elaboración de plantas medicinales (II). Boletín de Plantas Medicinales y Aromáticas 8.SIN 0718-0357
122. Poulton, J.E. 1990. Cyanogenesis in plants. *Plant Physiol.* 94:401
123. Puerta, A. & Mateos, F. 2010 .Enterobacters. *Revista Medicine.* 2010;10 (51):3426-31
124. Rahalison *et al.* 1993. Screening for antifungal activity of Panamenian plants. *Int. J. Pharmacog.* 31:68-76
125. Ramírez, J.F. & Ortiz, R.A. 1995. Crianza de las abejas sin aguijón. Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales. Universidad Nacional. Proyecto Regional de Apicultura y Meliponicultura. Costa Rica. p. 22
126. Ramos, G.; Frutos, P.; Giráldez, F.J. & Mantecón, A. R. 1998. Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. *Arch. Zootec.* 47(180):597
127. Reed, J. D.; Mcdowell, R. E.; Van Soest, P.J. & Horvath, P. J. 1982. Condensed tannins: a factor limiting the use of cassava forage.J. *Sci. Food. Agric.*, 33: 213
128. Regulación 28-02. 2001. Requisitos para la solicitud de inscripción, renovación y modificación en el registro de medicamentos de origen natural de uso humano. CECMED. MINSAP
129. Renteria, A. & Mora J. (2005). Compuestos Fenólicos. Universidad Central del Ecuador. p 25
130. Rivero, R. *et al.* 2002. *Rev. Cubana Plant Med.* 7 (1):32
131. Rodriguez, Ana. *et al.* 1994. Efecto alelopático de extracto de hojas de piñón florido (*Gliricidia sepium* Jacq. Steud.). Resúmenes. VII Jornada Científica. INIFAT. La Habana, Cuba. p. 59
132. Roig, J.T. 1974. Plantas medicinales aromáticas o venenosas de Cuba. Instituto del Libro. La Habana, Cuba. p. 644

133. Rojas, N. M. & Rodríguez, M. 2008 Actividad antimicrobiana de *Tectona grandis* L. f., *Bursera simaruba* (L.) Sarg.y *Cedrela odorata* L. *Revista Cubana de Planta Medicinales* 13(4): 127
134. Rojas, N.M.; Rodríguez, D. & Cuéllar, A. 2003. Actividad antibacteriana de flores de un genotipo cubano de *Hibiscus elatus* Sw. Memorias V Taller internacional sobre Recursos Filogenéticos: Fitogen. Sancti Spiritus: Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes, Ministerio de Agricultura
135. Rojas, Nidia.; Matos, Mariela. & Romeu, Beatriz. 2004. Actividad antibacteriana de *Boldoa purpurascens* Cav. Universidad de La Habana, *Rev cubana Plant Med* .9 (2)
136. Rosso, J.M & Nates, G. 2005. Meliponicultura: Una actividad generadora de ingresos y servicios ambientales. LEISA. *Revista de Agroecología* 21(1): 5-7
137. Ruíz, R. 1984. Nuevo Diccionario Médico. [Barcelona]. Teide S.A. p.113
138. Sablon, Amelia. 1985. Dendrología. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba. p. 65
139. Sabovljevic, A.; Sokovic, M.; Sabovljevic, M. & Grubisic, D. 2006. Antimicrobial activity of *Bryum argenteum*. *Fitoterapia*; 77:144
140. Salamanca, G.; Serra, J. A. & Quijano, M. 1999. Análisis cluster y niveles de fósforo total en algunas mieles tropicales colombianas. [Disponible en] <http://www.beekeeping.com/articulos/salamanca/fosforo.htm> [2. nov. 1999]
141. Sánchez, C. L. 2001. Métodos palinológicos, curso de capacitación al personal de PROMABOS. -CINAT-PARAM-UNA-UU. San Salvador, El Salvador. 15 p
142. Sánchez, F. & García, J. 1975. Estudio bacteriológico en lechones enfermos de la Granja "Zapotitlán". Tesis recepcional. Fac. Med. Vet. Zoot., UNAM, México
143. Sánchez, J.F. *et al.* 2002. La inducción del estrés en la pared celular del hongo *Sporothrix schenckii* genera una activación en la ruta de síntesis de hexosaminas. México: Instituto de Investigación en Biología Experimental. SEP-CONACYT. 2002
144. Sardiñas, J. A. 2009. Factores que influyen en la producción de semilla de *Gliricidia sepium* en el centro de Cuba. Tesis presentada en opción al Título Académico de Máster en Pastos y Forrajes. Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos", Cuba. p. 66
145. Seibert, B. 1988. Wood production of *G. sepium* (Jacq.) Walp. Shade trees in a cacao plantation. Nitrogen Fixing Tree Research Reports. 6:60

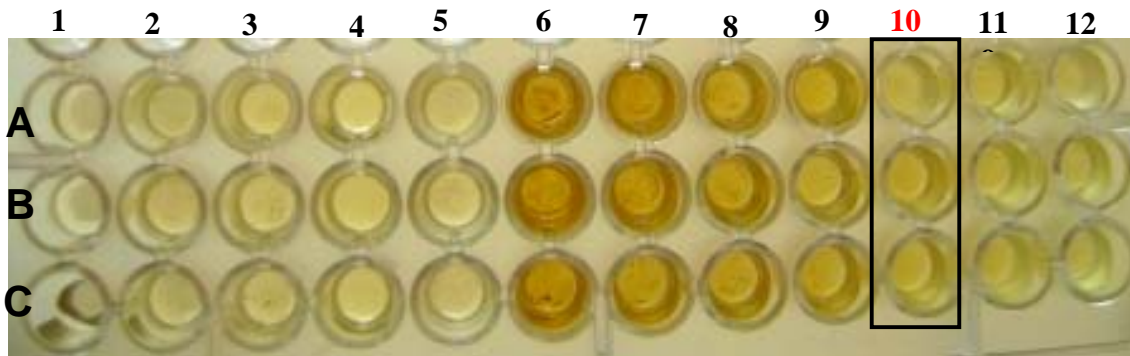
146. Shane G. 1979. Aspects of Antimicrobial Activity of Terpenoids and the Relationship to their Molecular Structure. *Physic Bulletin*, 30, p 262
147. Sikkema, J.; De Bont, J. & Poolman, B. 1995. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59:201-222
148. Simons, A.J. 1996. Ecology and reproductive biology. In: *Gliricidia sepium*: genetic resources for farmers. (Eds. J.L. Stewart, G.E. Allison & A.J. Simons). University of Oxford, United Kingdom. p. 22
149. Simons, L. 1996. Rol de los árboles y arbustos multipropósitos en las fincas ganaderas. En: Leguminosas forrajeras arbóreas en la agricultura tropical. (Ed. T. Clavero). La Universidad del Zulia, Venezuela. p. 41
150. Sluiter, A. 2008 b. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado. USA
151. Sluiter, A. *et al.* 2008 a. Determination of insoluble solids in pretreated biomass material. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-42627. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado. USA
152. Smith, H.W. & Jones, J.E.T. 1963. Observation on the alimentary tract and its bacterial flora in healthy and diseased pigs. *J. Pathol. Bacteriol.* 86:387
153. Sojka, W.J. 1971. Enteric Diseases in new-born piglets, calves and lambs due to *Escherichia coli* infection. *Vet. Bull.* 41: 509
154. Solís, A. 2000. Cuadro Resumen de los datos obtenidos sobre las abejas que no pican, a través de cuestionarios y entrevistas abiertas en Pueblo Nuevo Viñas, Santa Rosa. Documento del Laboratorio de Entomología. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. p. 89
155. Stafford, Helen. 1997. Roles of flavonoids insymbiotic and defense functions in legumes roots. *The Botanical Review.* 63 (1):27
156. Standley, P.C & Williams, L.O. 1964. Flora of Guatemala. Fieldiana: *Botany*; 24 (7):281
157. Suárez, J.; Simon, L. & Yepes, I. 1996. Uso de árboles y arbustos forrajeros en cercas vivas de La Habana y Matanzas. Resúmenes. Taller Internacional "Los Arboles en los Sistemas de Producción Ganadera". EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. p. 13
158. Tanner, G.J.; Moore, A.E. & Larkin, P. J. 1994. Proanthocyanidins inhibit hydrolysis of leaf proteins by rumen microflora *in vitro*. *Br.J.Nut.* 71:947

159. Tevini, M.; Braun, J. & Fieser, G. 1991. The protective function of the epidermal layer of rye seedlings against ultraviolet B radiation. *Photochemistry and Photobiology* , 53:329
160. Treybal, R.E. 1986. Operaciones con Transferencia de masa. [Ed]: Revolucionaria, La Habana, Cuba
161. U t'anYikél, K. 1991. Una ventana al mundo de las abejas nativas.. Artículo: Una Plática con Don Felipe Martínez López. Boletín #2. Mérida, Yucatán, México. 14 p
162. Ulloa, J.A, *et al.* 2010 La miel de abeja y su importancia. *Revista Fuente*. 2 (4):11
163. Umaña, E. Notas Apícolas Costarricenses. No. 11(01-2006).Centro de Investigaciones Apícolas (CINAT-UNA).pp. 9-16
164. Vadillo, S.; Píriz, S. & Mateos, E. 2002. Manual de Microbiología Veterinaria, Editorial, McGraw – Hill, Internacional. España. p. 738
165. Vázquez, Edith. & Torres, S. 2006. Libro de Fisiología Vegetal. Parte I. Editorial Félix Varela, Ciudad de La Habana, Cuba. p. 451
166. Vega, L. E.; Van Eljbos, Clara. & Moreno, L.A. 1987. Alley cropping with *G. sepium* (Jacq.) Walp. (Mata Ratón) and its effect on the soil losses on hillslopes in Uraba, Colombia. In: *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp.: management and improvement. Proceedings of a workshop held at CATIE. Turrialba, Costa Rica. *Nitrogen Fixing Tree Association*. Special Publication 87-01. p. 68
167. Vit, P. 2000. Una idea para valorizar la meliponicultura latinoamericana. Laboratorio de Apiterapia y Vigilancia Ambiental, Dpto. de Ciencias de los Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad de Los Andes, Mérida. Venezuela. p. 35
168. Vit, P. & Jacob, J.T. 2008. Putative anticataract properties of honey studied by the action of flavonoids on a lens culture model. *Journal of Health Science*. 54 (2): 196
169. Wagner, H. & Bladt, S. 2001. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Second Edition. Springer Berlim. Germany. p. 215
170. Wagner, H.; Bladt, S. & Zgainski, E. M. 1984. Plant Drug Analysis. Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München. Germany p. 307
171. Wang, Y. *et al.* 1996. Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon the digestion of methionine and cysteine in the small intestine of sheep. *J.Agric.Sci.Camb.*127: 413

172. Wayne, P.A. National for Committee Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In 12<sup>th</sup> informational Supplement M100S12. 2002b; NCCLS document M100S12
173. Wayne, P.A. 2002. National for Committee Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast, approved standard a; NCCLS document M27-A. p. 2
174. Wong, E. 1973. Plant phenolic in chemistry and biochemistry of herbage. [Ed] G. W. Butler, and R.W Bailey, Vol.1, Academic Press. London. United Kingdom.p. 265
175. Wulf, M. 1998. Aspectos sobre la dinámica de la producción de néctar en el ulmo (*Eucryphia cordifolia* Cav.). Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. Chile. p.94
176. Zadoks, R. N. 2002. Molecular and mathematical epidemiology of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* mastitis in dairy herds. Dissertation Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine: 2-3.p. 239

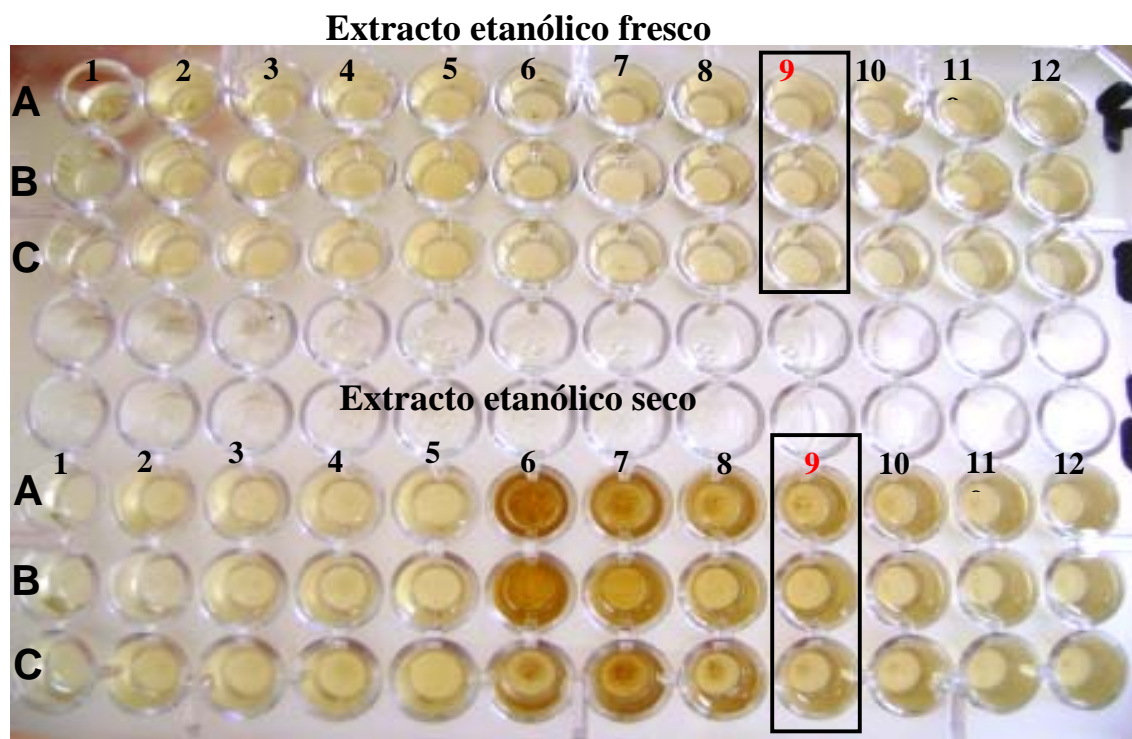
## ANEXOS

Anexo 1. Concentración mínima inhibitoria del extracto seco etanólico frente a la bacteria *Staphylococcus aureus*.



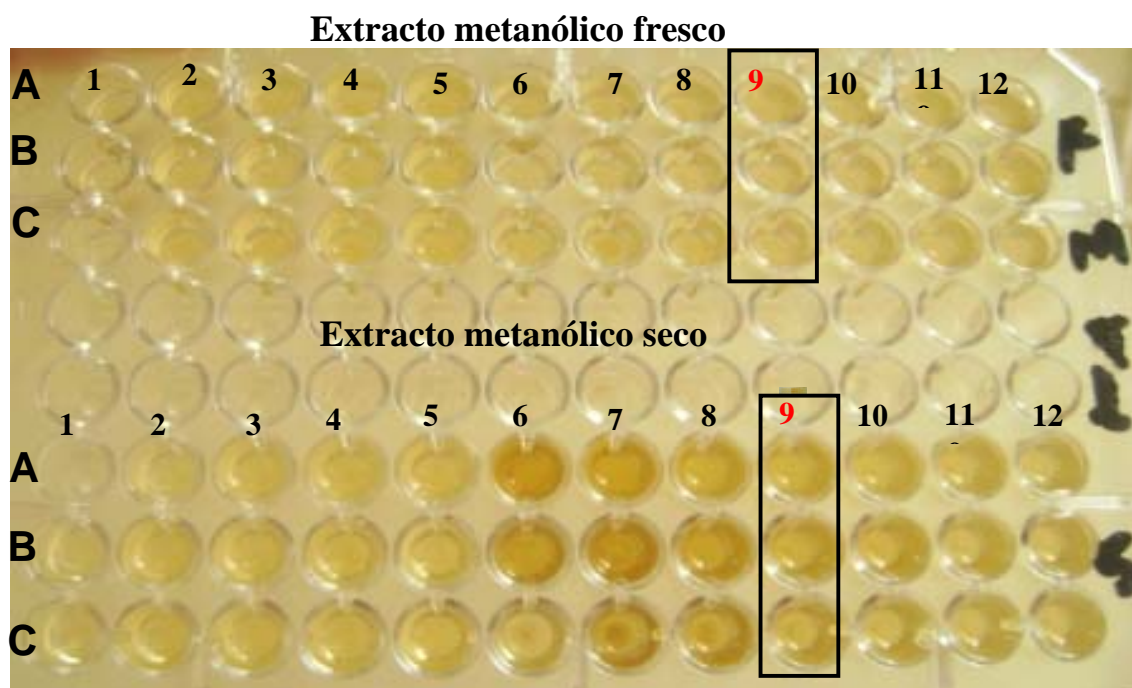
1: caldo Mueller Hinton; 2:caldo Mueller Hinton y bacteria; 3:caldo Mueller Hinton, bacteria y etanol; 4:caldo Mueller Hinton, bacteria y amoxicilina; 5: caldo Mueller Hinton, bacteria y cefalexina; 6:caldo Mueller Hinton, bacteria y extracto (CMI=150 mg/mL);7:caldo MuellerHinton, bacteria y extracto(CMI=75 mg/mL); 8:caldo Mueller Hinton, bacteria y extracto(CMI=37,50 mg/mL);9:caldo Mueller Hinton, bacteria y extracto(CMI=18,75 mg/mL);10:caldo Mueller Hinton, bacteria y extracto(**CMI=9,37 mg/mL**);11:caldo Mueller Hinton, bacteria y extracto(CMI=4,69 mg/mL);12:caldo Mueller Hinton, bacteria y extracto (CMI=2,34 mg/mL), **A,B** y **C** son réplicas.

Anexo 2. Concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico (fresco y seco) de flores de *G.sepium* de *Meliponabeecheii* frente a la bacteria *Pseudomona aeruginosa*.



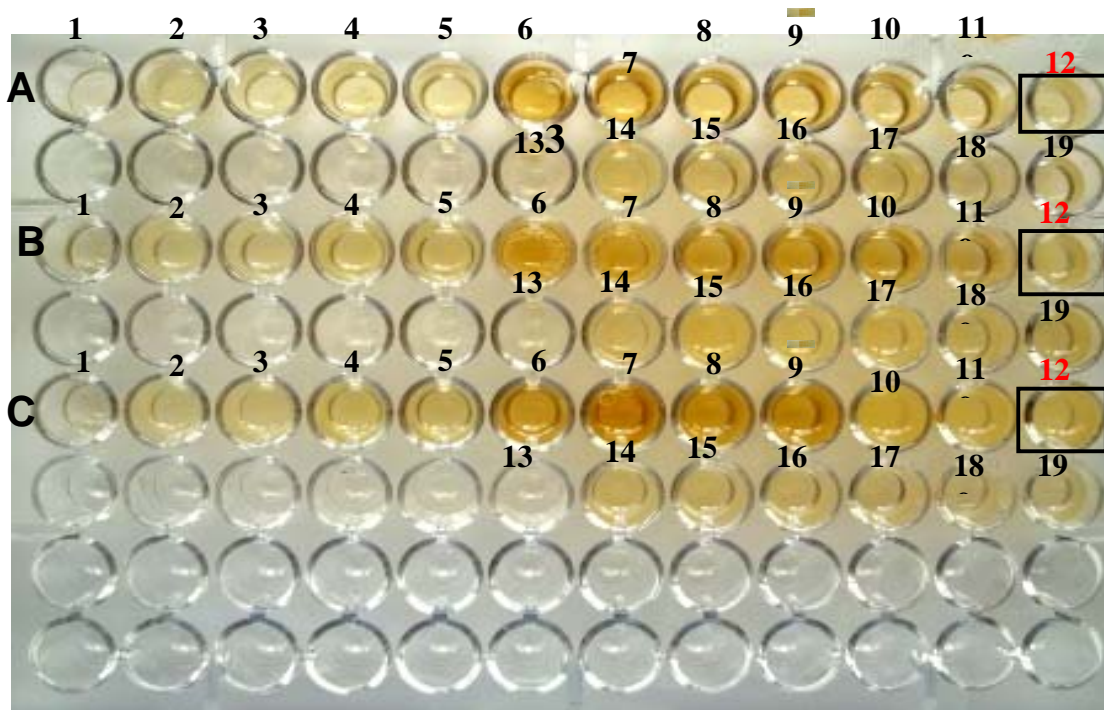
1: caldo Mueller Hinton; 2:caldo Mueller Hinton y bacteria; 3:caldo Mueller Hinton, bacteria y etanol; 4:caldo Mueller Hinton, bacteria y ciprofloxacino; 5: caldo Mueller Hinton, bacteria y cefalexina; 6:caldo Mueller Hinton, bacteria y extracto (CMI=150 mg/mL);7:caldo MuellerHinton, bacteria y extracto(CMI=75 mg/mL); 8:caldo Mueller Hinton, bacteria y extracto(CMI=37,50 mg/mL);**9:caldo Mueller Hinton, bacteria y extracto(CMI=18,75 mg/mL)**;10:caldo Mueller Hinton, bacteria y extracto(CMI=9,37 mg/mL);11:caldo Mueller Hinton, bacteria y extracto(CMI=4,69 mg/mL);12:caldo Mueller Hinton, bacteria y extracto (CMI=2,34 mg/mL), **A,B** y **C** son réplicas.

Anexo 3. Concentración mínima inhibitoria del extracto metanólico (fresco y seco) de flores de *G.sepium* de *Meliponabeecheii* frente a la bacteria *Pseudomona aeruginosa*.



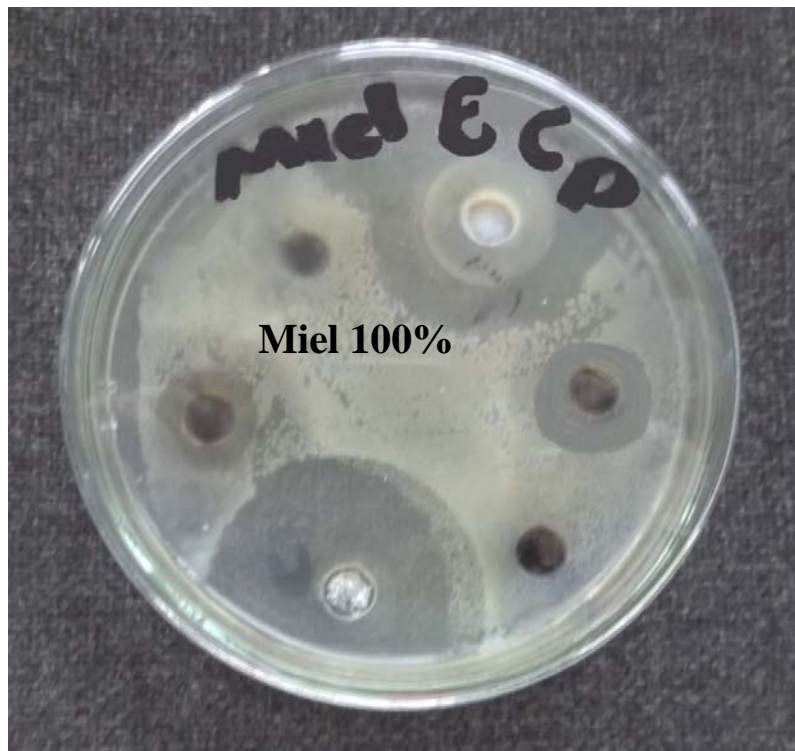
1: caldo Mueller Hinton; 2:caldo Mueller Hinton y bacteria; 3:caldo Mueller Hinton, bacteria y metanol; 4:caldo Mueller Hinton, bacteria y ciprofloxacino; 5: caldo Mueller Hinton, bacteria y cefalexina; 6:caldo Mueller Hinton, bacteria y extracto (CMI=150 mg/mL);7:caldo MuellerHinton, bacteria y extracto(CMI=75 mg/mL); 8:caldo Mueller Hinton, bacteria y extracto(CMI=37,50 mg/mL);**9:caldo Mueller Hinton, bacteria y extracto(CMI=18,75 mg/mL)**;10:caldo Mueller Hinton, bacteria y extracto(CMI=9,37 mg/mL);11:caldo Mueller Hinton, bacteria y extracto(CMI=4,69 mg/mL);12:caldo Mueller Hinton, bacteria y extracto (CMI=2,34 mg/mL), **A,B** y **C** son réplicas.

Anexo 4. Concentración mínima inhibitoria de la miel de *Melipona beecheii* frente a la bacteria *Pseudomona aeruginosa*.

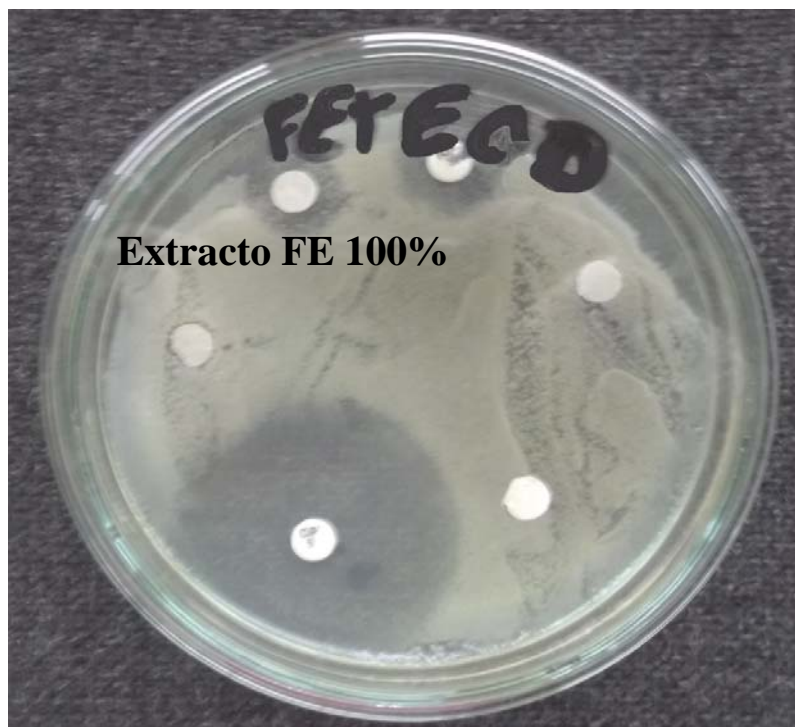


1: caldo Mueller Hinton; 2:caldo Mueller Hinton y bacteria; 3:caldo Mueller Hinton, bacteria y agua peptonada; 4:caldo Mueller Hinton, bacteria y ciprofloxacino; 5: caldo Mueller Hinton, bacteria y cefalexina; 6:caldo Mueller Hinton, bacteria y miel (CMI=150 mg/mL);7:caldo MuellerHinton, bacteria y miel (CMI=75 mg/mL); 8:caldo Mueller Hinton, bacteria y miel (CMI=37,50 mg/mL);9:caldo Mueller Hinton, bacteria y miel (CMI=18,75 mg/mL);10:caldo Mueller Hinton, bacteria y miel (CMI=9,37 mg/mL);11:caldo Mueller Hinton, bacteria y miel (CMI=4,69 mg/mL);12:caldo Mueller Hinton, bacteria y miel (**CMI=2,34 mg/mL**);13: caldo Mueller Hinton, bacteria y miel (CMI=1,17 mg/mL);14:caldo Mueller Hinton, bacteria y miel (CMI=0,59 mg/mL);15: caldo Mueller Hinton, bacteria y miel (CMI=0,29 mg/mL);16: caldo Mueller Hinton, bacteria y miel (CMI=0,15 mg/mL);17: caldo Mueller Hinton, bacteria y miel (CMI=0,07 mg/mL);18: caldo Mueller Hinton, bacteria y miel (CMI=0,04 mg/mL);19: caldo Mueller Hinton, bacteria y miel (CMI=0,02 mg/mL); **A, B y C** son réplicas.

Anexo 5. Actividad antimicrobiana de la miel de *Melipona beecheii* frente a la bacteria *Escherichia coli* utilizando el método de perforaciones en agar.



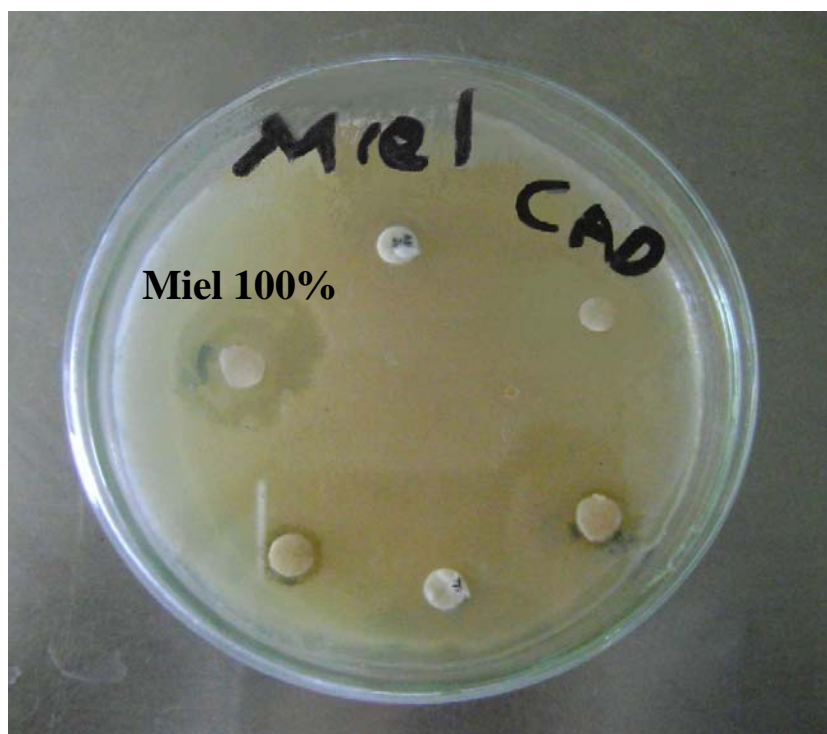
Anexo 6. Actividad antimicrobiana del extracto fresco etanólico de flor de *G.sepium* frente a la bacteria *Escherichia coli* utilizando el método de disco-placa-cultivo.



Anexo 7. Actividad antimicrobiana de la miel de *Melipona beecheii* frente a la bacteria *Candida albicans* utilizando el método de perforaciones en agar.



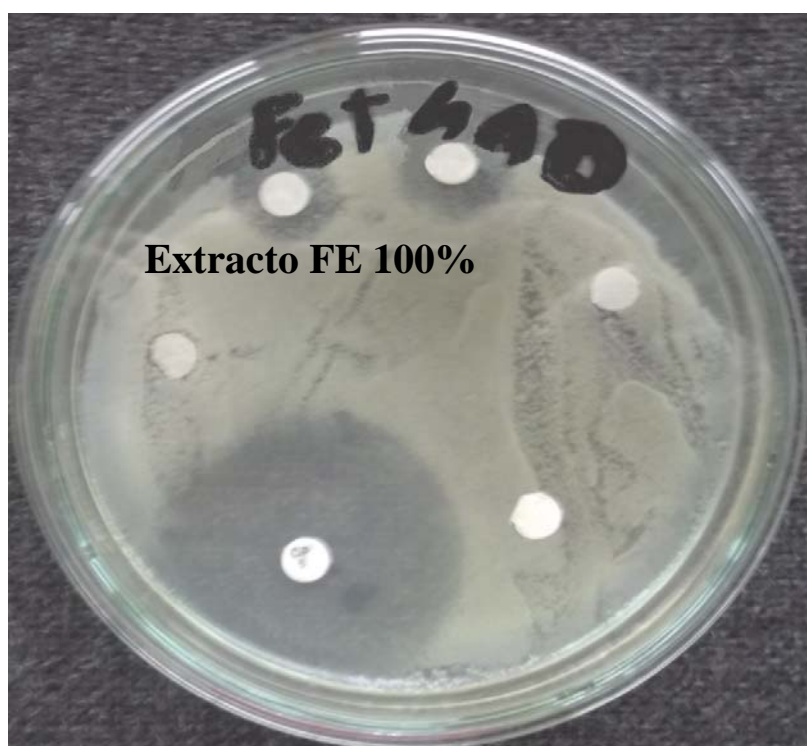
Anexo 8. Actividad antimicrobiana de la miel de *Melipona beecheii* frente a la bacteria *Candida albicans* utilizando el método de disco-placa-cultivo.



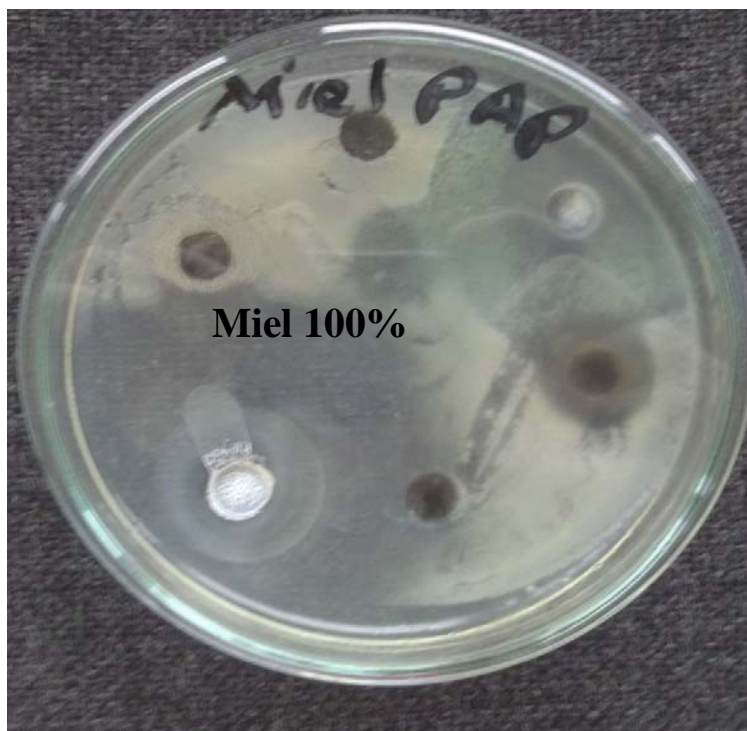
Anexo 9. Actividad antimicrobiana de la miel de *Melipona beecheii* frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* utilizando el método de perforaciones en agar.



Anexo 10. Actividad antimicrobiana del extracto fresco etanólico de flor de *G. sepium* frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* utilizando el método de disco-placa-cultivo.



Anexo 11. Actividad antimicrobiana de la miel de *Melipona beecheii* frente a la bacteria *Pseudomona aeruginosa* utilizando el método de perforaciones en agar.



Anexo 12. Actividad antimicrobiana del extracto seco metanólico de flor de *G sepium* frente a la bacteria *Pseudomona aeruginosa* utilizando el método de disco-placa-cultivo.

