

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**“CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MIEL BLANCA
PRODUCIDA POR *MELIPONA BEECHEII* EN GUATEMALA”**



INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR

MARÍA JOSÉ DARDÓN PERALTA

PARA OPTAR AL TÍTULO DE

BIÓLOGA

Guatemala, Noviembre del 2005

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

DL

06

T(23691

JUNTA DIRECTIVA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

MSc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	DECANO
Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona	SECRETARIA
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	VOCAL I
Licda. Lilibian Vides de Urizar	VOCAL II
Licda. Beatriz Eugenia Bates de Jimenéz	VOCAL III
Br. Juan Francisco Carrascoza Mayén	VOCAL IV
Br. Susana Elizabeth Aguilar Castro	VOCAL V

AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarme la capacidad y oportunidad de realizar este trabajo...

A la Ing. Vilma Landaverde por su invaluable apoyo para la identificación de los tipos polínicos presentes en las muestras de miel, al Laboratorio de Palinología de la Universidad de El Salvador, PROMABOS y Mabel Vásquez...

Al Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica, en especial a la Licda. Margarita Paz y Licda. Isabel Gaitán por el apoyo y asesoría en la determinación de la actividad antibacteriana de las muestras de miel...

A la Escuela de Química por el apoyo, material y equipo para la determinación de las características fisicoquímicas de la miel...

A los meliponicultores que brindaron muestras para este estudio y a los Biólogos Armando Higueros, Alicia Arévalo y Alejandro Fuentes...

A Carmen Lucía Yurrita por la asesoría en el trabajo con abejas sin aguijón, el apoyo brindado y a estar siempre dispuesta a buscar una solución...

A Eunice Enríquez por la revisión del trabajo y el incentivo para el estudio de las abejas sin aguijón...

Al AGROCYT por el apoyo brindado para el estudio de la meliponicultura en nuestro país...

Al Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología -LENAP- por ser una escuela para la investigación en Guatemala...

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
3. ANTECEDENTES	3
4. JUSTIFICACIÓN	11
5. OBJETIVOS	13
6. HIPÓTESIS	14
7. MATERIALES Y MÉTODOS	15
8. RESULTADOS	22
9. DISCUSIÓN	29
10. CONCLUSIONES	37
11. RECOMENDACIONES	39
12. REFERENCIAS	40
13. ANEXOS	45

1. RESUMEN

Melipona beecheii es una abeja nativa de la región mesoamericana, cuyos productos fueron empleados por los mayas desde tiempos prehispánicos (De Jong 1999). Hoy en día la miel es el principal producto obtenido de ésta abeja, la cual se emplea para fines alimenticios y terapéuticos. En regiones como Santa Rosa y Chiquimula la miel es utilizada para el tratamiento de afecciones respiratorias y dermatológicas (Enríquez *et al.* 2004). Actualmente existe una propuesta para determinar los estándares de calidad de la miel de abejas sin aguijón, entre las que se incluye *Melipona beecheii*, con el objetivo de impulsar el comercio de la miel de estas abejas a nivel internacional (Vit *et al.* 2004).

Esta investigación buscaba conocer las características fisicoquímicas y antibacterianas de mieles de *Melipona beecheii* de 6 departamentos de Guatemala. Se evaluaron cinco características fisicoquímicas obteniendo como valores promedio; pH de 4.07, acidez de 57.17 meq/100 g de miel, cenizas 0.17 g /100 g de miel, 0.55 mg de HMF/Kg de miel y humedad de 23.67 g/100 g de miel. Se comprobó la actividad antibacteriana de la miel contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, la cual es efectiva en el rango de 2.5 a 5% de concentración. Además, se realizaron análisis melisopalinológicos en los que se determinó la presencia de 20 familias y 36 especies vegetales que visita *Melipona beecheii* en nuestro país.

Estos datos deben ser considerados como preliminares, ya que es la primera investigación de miel de meliponinos en nuestro país y fue empleada una muestra de miel de cada departamento propuesto. Por lo que es necesario desarrollar estudios que permitan realizar análisis estadísticos para dar validez a los resultados. Los datos presentados en esta investigación pueden ser empleados por los meliponicultores para respaldar las cualidades atribuidas popularmente a la miel de *Melipona beecheii* y así incentivar el comercio de la misma.

2. INTRODUCCIÓN

Las abejas sin aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) se encuentran exclusivamente en los trópicos. Existen alrededor de 400 especies de abejas sin aguijón, de las cuales aproximadamente 300 especies habitan en América tropical. Este grupo junto con los integrantes de la subfamilia Apinae, se caracterizan porque son altamente sociales, viven en colonias y almacenan grandes cantidades de alimento, como miel y polen. Los himenópteros son el grupo más importante en la polinización de las plantas, indispensables en los procesos ecológicos de los bosques y plantas cultivadas (Roubik 1992; Villanueva 2003; Amador 1991).

Melipona beecheii es una de las especies de abejas sin aguijón, útil para la producción de miel y cera. Estos productos son destinados generalmente para consumo familiar y en algunos casos destinados para el comercio de subsistencia, llegando a ser una fuente alterna de ingresos familiares (Enríquez *et al.* 2004). El manejo de estas abejas se reporta desde épocas prehispánicas, en la que los antiguos mayas aprendieron a reproducir abejas nativas y llegaron a formar Meliponarios de gran tamaño (Villanueva 2003).

A la miel de *Apis mellifera* se le atribuyen propiedades terapéuticas, lo que ha propiciado el desarrollo de diversos trabajos de investigación, en los que se han reconocido cualidades como su acidez, osmolaridad, presencia de peróxido de hidrógeno, etc. (Molan 1992). La investigación de la miel de abejas sin aguijón ha sido escasa, por lo que se hace necesario generar información acerca de ésta miel, la cual es señalada por el conocimiento popular como un excelente tratamiento para diversas enfermedades (Enríquez *et al.* 2004). El propósito de esta investigación era conocer las características de la miel de *Melipona beecheii*, por lo que fue realizada una caracterización de las cualidades fisicoquímicas y antibacterianas de la miel. Así mismo se determinó el tipo polínico presente en cada una de las muestras de miel identificando las familias vegetales.

3. ANTECEDENTES

ABEJAS NATIVAS SIN AGUIJON O MELIPONINOS

Dentro del orden Hymenoptera, superfamilia Apoidea están incluidas las abejas, las cuales son de gran importancia debido a que juegan un papel importante en los procesos ecológicos como polinizadores de plantas, al coleccionar polen y néctar o aceites de angiospermas, éstos los emplean para proveer alimento a sus larvas. Las abejas miden entre 2 y 39 mm de largo, sin embargo existen algunas con mayor tamaño. La mayoría presenta una biomasa de menos de 1 mg a más de 1 g. Se caracterizan por presentar en el cuerpo bastante pelo, el cual suele ser ramificado o plumoso (Ayala 1998; Marroquín 2000).

Se clasifican en 11 familias que incluyen más de 20,000 especies en todo el mundo. Dentro de la familia Apidae, se encuentran las abejas sin aguijón (Meliponinae) y las abejas de miel (Apinae), las cuales son las únicas subfamilias que presentan colonias que acumulan grandes cantidades de alimento. Las abejas sin aguijón, exclusivas de los trópicos y subtropicos, alcanzan las 400 especies y son más abundantes en los trópicos de América (Ayala 1999). En Guatemala se han identificado a la fecha 32 especies de meliponinos, sin embargo estos son resultados parciales ya que no se han realizado colectas en todo el país para determinar la diversidad (Com pers Enríquez 2005).

MELIPONA BEECHEII

Una de las especies productoras de miel más conocida en mesoamericana es *Melipona beecheii*, una abeja sin aguijón nativa de la región (de Jong 1999). Presenta una longitud del cuerpo entre 9.7-10.7 mm, el integumento en su mayoría es negro y en el tórax presenta pubescencia blanquecina, con dibujos amarillos, pardos y negros en las patas. Su distribución va desde México hasta Costa Rica (Ayala 1999).

Esta abeja es una de las especies más utilizada en la Meliponicultura desde épocas precolombinas, los antiguos mayas de la Península de Yucatán practicaban la crianza de diversas especies de abejas sin aguijón nativas del área. *Melipona beecheii* alcanzó un mayor desarrollo debido a que es una especie de fácil manejo, abundante en el área y en especial a que su miel era utilizada en rituales ceremoniales, como producto medicinal y alimenticio (de Jong 1999; Villanueva 2003).

En la actualidad algunas personas mantienen colmenas de *Melipona beecheii* con el objetivo de aprovechar su miel con fines alimenticios y medicinales. La miel de esta abeja es de color amarillo claro y por eso es llamada "miel blanca". En nuestro país esta miel llega a ser comercializada entre Q. 80.00 a Q. 200.00 por botella. Los meliponicultores reconocen el beneficio económico que tiene la comercialización de la miel de *Melipona beecheii*, la cual tiene una alta demanda debido a las propiedades medicinales que se le atribuyen popularmente (*Obs pers* 2004).

MIEL DE MELIPONINOS

La miel producida por *Apis mellifera* ha sido definida como un fluido dulce, denso, transparente y viscoso; resultante de la acción enzimática de las abejas sobre el néctar de las flores y exudados de las partes vivas de las plantas. De éste modo el néctar es enriquecido con fermentos, ácidos y albúmina de la abeja (López 1997; White 1971). En general la miel presenta diversas características las cuales han sido estudiadas para reconocer diversos tipos de miel, estas características llegan a variar por factores como el recurso floral disponible para la obtención de polen y néctar (Molan 1992). La composición bioquímica de la miel esta determinada principalmente por una alta cantidad de monosacáridos, que constituyen del 53 al 80% de la miel; agua, alrededor de un 23 al 31%; minerales y sustancias nitrogenadas; ácidos orgánicos los cuales confieren a la miel un pH de 3.6 a 4.2, entre otros compuestos (Vit et al. 1998).

Para el análisis de mieles se han propuesto diversas pruebas físico-químicas, algunas de las cuales presentan elevados costos para su realización. Existen 7 características físico-químicas utilizadas para determinar la calidad de la miel de *Apis mellifera*, actualmente se propone que los valores de estos parámetros sean modificados para que la miel producida por las abejas sin aguijón pueda ser comercializada a nivel internacional (Vit, *et al.* 2004). Las pruebas más importantes y accesibles son las de acidez libre y total, humedad, azúcares y cenizas. Estas pruebas nos indican las principales características de la miel, las cuales muchas veces se relacionan con las propiedades antibacterianas.

En la siguiente tabla se presentan los valores estándares máximos, sugeridos para la Comisión del Codex Alimenticio para la composición de la miel del género *Melipona*.

Tabla 1. Composición de la miel de *Melipona* propuesta a la Comisión del Codex Alimenticio

Composición de la miel	<i>Melipona</i>
Contenido de agua (g/100g)	Max. 30.0
Azúcares reductores (g/100g)	Min. 50.0
Sucrosa (g/100g)	Max. 6.0
Acidez (meq/100g)	Max. 70.0
Cenizas (g/100g)	Max. 0.5
Hidroximetilfurfural (mg/kg)	Max. 40.0
Actividad de la Diastasa (DN)	Min. 3.0

Fuente: Vit, *et al.* 2004.

USOS DE LA MIEL

La miel de *Apis mellifera* ha sido utilizada con fines terapéuticos desde la época prehistórica. Se reporta que hace más de 6 000 años, en Egipto se utilizaba para envolver objetos orgánicos y así evitar su descomposición, llegando a utilizarla para embalsamar a sus muertos (López 1997). Aristóteles y Dioscorides recomendaban la miel colectada en lugares específicos y de determinada estación del año, para el tratamiento de diversas enfermedades, esto con relación al recurso floral disponible para la producción de miel (Molan 1992). En 1971 se demostró con rigor científico que trozos de origen animal, cubiertos con miel conservaron su frescura a temperatura ambiente durante 4 años, mientras que los trozos cubiertos con miel artificial comenzaron a descomponerse al quinto u octavo día (Asís 1997).

USOS DE LA MIEL DE MELIPONINOS

En Mesoamérica, antes de la conquista española, los mayas criaban abejas nativas sin aguijón, alcanzando un gran desarrollo ya que se reportan Meliponarios con miles de colmenas. La miel de estas especies era utilizada con fines ceremoniales, como producto medicinal y alimenticio, sin embargo con la llegada de los españoles a América se introdujo la abeja europea, quien posee mayor capacidad de producción de miel desplazando la crianza de abejas nativas (Villanueva 2003). Actualmente, en Guatemala la crianza de abejas sin aguijón esta restringida a pequeños grupos, quienes atribuyen propiedades medicinales a la miel para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, oftalmológicas y dermatológicas. La miel producida por esta abeja es conocida como miel blanca y en lugares como Pueblo Nuevo Viñas, Santa Rosa y Esquipulas, Chiquimula, suelen emplearla para el tratamiento de enfermedades como diarrea, gastritis, llagas, problemas respiratorios, golpes, dietas post-parto, insomnio, manchas en la cara, dolores menstruales y como vitaminas (Enríquez, *et al.* 2004).

Este tipo de prácticas terapéuticas populares han despertado el interés de realizar diversos trabajos de investigación en países como Venezuela, México y Costa Rica, en donde se ha evaluado la actividad antibacteriana de la miel, además de determinar las características físico-químicas de la misma. Se ha demostrado que existe relación entre las características de la miel y la zona geográfica de la cual provienen, por lo que es primordial la caracterización de las mieles de cada región (Vit *et al.* 1994; Vit *et al.* 2004; Demera & Angert 2004; Grajales *et al.* 2003; Molan 1992).

Se ha planteado la necesidad de estipular los estándares de calidad para la miel de estas abejas con el objetivo de abrir un mercado internacional para su venta, tomando en cuenta parámetros fisicoquímicos, biológicos y su actividad antibacteriana (Vit *et al.* 2004). Este tipo de investigación valida el conocimiento popular que le atribuye propiedades medicinales a la miel.

CARACTERÍSTICAS DE LA MIEL

La miel presenta diversas características, las cuales han sido estudiadas para identificar diversos tipos de miel, se reporta que éstas llegan a variar por la región biogeográfica de la cual provienen (Vit *et al.* 1994; Vit *et al.* 2004; Demera & Angert 2004; Grajales *et al.* 2003; Molan 1992).

A. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS

Las características fisicoquímicas suelen ser realizadas para determinar las cualidades de la miel, principalmente con fines de comercialización. Varios parámetros utilizados para evaluar la miel de *Apis mellifera*, han sido modificados para que la miel producida por las abejas sin aguijón sea incluida bajo el término de "miel". Las pruebas realizadas para evaluar estas características son necesarias para la aceptación de la miel en el mercado internacional.

Además algunas características fisicoquímicas han sido vinculadas con las propiedades terapéuticas de la miel. Los análisis fisicoquímicos propuestos para mieles de meliponinos incluyen el hidroximetilfurfural, cenizas, azúcares, actividad de la diastasa, pH y acidez.

El hidroximetilfurfural es un aldehído presente en la miel formado por la presencia de azúcares invertidos, obtenidos por la hidrólisis ácida de los azúcares presentes en las mieles (Estrada 1991). La miel presenta pequeñas cantidades de hidroximetilfurfural. El almacenamiento aumenta la cantidad de hidroximetilfurfural al igual que la temperatura a la que la miel ha sido expuesta. Por lo general las adulteraciones de la miel son fáciles de detectar debido a valores altos de hidroximetilfurfural. Las cenizas suelen ser calculadas para determinar la adulteración de mieles. Para el caso de *Melipona* la cantidad de cenizas es relativamente bajo, con rango entre 0.04-0.61 gramos, lo cual se atribuye al recurso floral, sin embargo no se han realizado estudios que comparen las cantidades de ceniza con muestras de miel provenientes de distintas regiones fitogeográficas. La cantidad máxima de cenizas permitida en Venezuela es de 0.5% y las mieles que presentan cantidades mayores se les considera alteradas (Vit *et al.* 1994).

La composición de azúcares presentes en las muestras de miel depende de los azúcares presentes en las fuentes de recursos florales y de las enzimas secretadas por las abejas. Se reporta que la cantidad total de azúcares reductores entre las especies de abejas sin aguijón oscilan entre el 48.18% y el 79.94%. La sacarosa es uno de los azúcares más importantes y suele encontrarse entre un 1.09 a 12.3% en el caso de *Melipona*. La actividad de la diastasa, enzima encargada de la degradación del almidón, esta vinculada con la actividad antibacteriana de la miel (Villena & Bicudo 1999).

B. RECURSO FLORAL

El recurso floral de cada región es un factor que influye en las características de las mieles (Demera & Angert 2004). Son muchas las especies vegetales que las abejas utilizan para su beneficio, las cuales difieren del hábitat en que se encuentran las abejas (Roubik 1992). En general, la miel producida principalmente a partir de una o pocas plantas específicas, se denomina miel unifloral o monofloral (polen predominante > 45%). Otro tipo de miel es cuando hay varios tipos de polen, denominándola polifloral (Sánchez 2001). Para conocer el polen utilizado por las abejas, se realiza la técnica de acetólisis la cual puede ser aplicada a muestras de miel. Permite reconocer la procedencia de la miel, identificar plantas venenosas para las abejas o para el consumo humano en caso de contener polen de plantas tóxicas. Es empleada con fines comerciales para controlar la calidad de las mieles (Girón 1996).

C. ACCIÓN ANTIBACTERIANA O TERAPÉUTICA

Se ha vinculado la acción antibacteriana de la miel de *Apis mellifera* con factores como la acidez, osmolaridad, presencia de peróxido de hidrógeno e inhibinas (López 1997). La actividad terapéutica de la miel ha sido tema de estudio en trabajos de investigación, en los que se ha demostrado la acción antibacteriana de mieles provenientes de distintas regiones. Debido a esto se ha relacionado las propiedades terapéuticas de la miel con el recurso floral disponible para la obtención de polen y néctar (Molan 1992).

Se ha determinado que la actividad antibacteriana de la miel de meliponinos llega a variar dependiendo de la región fitogeográfica de la que provengan las muestras de miel (Demera & Angert 2004). Una de las bacterias más utilizadas para determinar esta acción es *Staphylococcus aureus* la cual no es afectada por factores como la osmolaridad, por lo que resulta idónea para este tipo de estudios (Grajales *et al.* 2003).

C. 1 *Staphylococcus aureus*:

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia Micrococcaceae, bacterias con apariencia de masas de cocos grampositivos, los cuales son organismos catalasa-positivos. Su diámetro promedio es de 1 μm , pero varía según la edad y la especie, son inmóviles y no esporoformadores. Los estafilococos se desarrollan dentro de un amplio margen de temperatura (12° a 45 °C), sin embargo la temperatura óptima es de 37 °C. Son organismos anaerobios facultativos, pero se desarrollan mejor en presencia de oxígeno libre (Walker 2000 ; Pelczar, *et al.* 1997).

Staphylococcus aureus se considera patógeno y es una de las cuatro causas principales de infecciones nosocómicas, junto con *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*. *Staphylococcus aureus* es un residente normal de la nariz y del intestino del 30 al 50% de la población en general. Tiempo atrás, la mayoría de cepas de *Staphylococcus aureus* eran vulnerables a la penicilina, sin embargo han aparecido cepas resistentes a los antibióticos lo que ha generado problemas. Se conoce que el 90% del personal de hospitales porta el microorganismo en donde es común la presencia de cepas resistentes a antibióticos, por lo que personas hospitalizadas corren el riesgo de contagiarse con este tipo de estafilococos (Pelczar, *et al.* 1997).

Staphylococcus aureus ha demostrado versatilidad en su habilidad para desarrollar resistencia a antibióticos clínicamente efectivos, es un agente causal de más del 10% de infecciones nosocomiales, 20% de intoxicación alimenticia y 10% de infecciones quirúrgicas (Vega 1991). La utilización de medicamentos naturales, como la miel, es una alternativa al uso de medicamentos químicos que actualmente generan resistencia en esta bacteria.

4. JUSTIFICACIÓN

Más de 500 especies de abejas sin aguijón se encuentran distribuidas en la región tropical y subtropical del mundo. Son abejas nativas del nuevo mundo y se conoce que en la región de Mesoamérica se practicaba la meliponicultura desde tiempos prehispánicos. Evidencias que se encuentran en el Códice Maya, en donde se reporta la existencia de dioses mayas vinculados a las abejas nativas, como *Bakau*, *Balam Cab* y *Ah Mucen Kab* (Vit et al. 2004).

En Guatemala la meliponicultura es una actividad llevada a cabo principalmente en comunidades rurales. Se reporta la crianza de abejas nativas sin aguijón en los departamentos de Santa Rosa y Chiquimula. En estos lugares la meliponicultura se desarrolla artesanalmente, por lo que algunas personas mantienen colmenas en sus casas y utilizan la miel con fines alimenticios. Popularmente se le atribuyen propiedades medicinales a los productos de la colmena de las abejas nativas sin aguijón, en especial a la miel blanca, producida por *Melipona beecheii*, la cual emplean para el tratamiento de enfermedades respiratorias, gastrointestinales y dermatológicas (Enríquez, et al. 2004).

A nivel internacional existe un interés en determinar estándares de calidad para la miel de las abejas sin aguijón con el objetivo de abrir un mercado internacional para su venta (Vit et al. 2004). Para conocer las cualidades de la miel debe realizarse una caracterización en la que se incluyan aspectos físico-químicos y biológicos para conocer su composición. Entre estos se puede mencionar: humedad, acidez, cenizas, pH e hidroximetilfurfural. Otro parámetro que debe ser estudiado es la diversidad floral que emplean las abejas para la producción de miel, la cual se vincula con la calidad de la misma. Para esto se utilizan análisis melisopalinológicos para identificar los granos de polen en muestras de miel.

Es necesario validar el conocimiento popular que atribuye propiedades medicinales a la miel blanca, producida por *Melipona beecheii* en Guatemala, para el tratamiento de heridas y golpes. *Staphylococcus aureus* es una de las bacterias oportunistas causante de enfermedades cutáneas; por lo que al ser comprobada la actividad de la miel de *Melipona beecheii* sobre *Staphylococcus aureus*, ésta puede ser propuesta como una alternativa más económica para el tratamiento de enfermedades causadas por esta bacteria, la cual se conoce ha desarrollado resistencia a diversos antibióticos.

La caracterización de la miel de meliponinos en Guatemala, especialmente *Melipona beecheii*, es una prioridad para el impulso de la meliponicultura en nuestro país. Esta caracterización traería beneficios económicos para los meliponicultores, ya que al conocer las cualidades de la miel de *Melipona beecheii* en nuestro país puede llegar a comercializarse este producto. Para esto debe conocerse las características fisicoquímicas y la actividad antibacteriana de la miel, información que apoyará las cualidades que se le atribuyen popularmente. Además, la meliponicultura es una actividad relacionada con los procesos ecológicos de bosques y cultivos, las abejas al buscar recursos alimenticios polinizan diversidad de plantas nativas contribuyendo en la conservación de bosques.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General:

Realizar una caracterización fisicoquímica y antibacteriana de la miel blanca de Guatemala para contribuir al establecimiento de parámetros de calidad.

5.2 Objetivos Específicos:

5.2.1 Conocer 5 características físico-químicas de seis muestras de miel de *Melipona beecheii* de los seis departamentos de Guatemala.

5.2.2 Determinar la actividad antibacteriana de las muestras de miel de *Melipona beecheii* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *in vitro*, de seis departamentos de Guatemala.

5.2.3 Determinar la procedencia polínica (hasta familias) del recurso floral que la abeja *Melipona beecheii* utiliza como alimento, presente en las muestras de miel de seis departamentos de Guatemala.

6. HIPÓTESIS

De las seis muestras de miel de *Melipona beecheii* empleadas en esta investigación, por lo menos una presenta actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *in vitro*.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 UNIVERSO:

7.1.1 POBLACIÓN:

Mieles de *Melipona beecheii*

7.1.2 MUESTRA:

Una muestra de miel de *Melipona beecheii* de cada departamento:

1. Petén, San Benito
2. Quiché, Nebaj
3. Santa Rosa, Pueblo Nuevo Viñas
4. Guatemala, Guatemala
5. Chiquimula, Esquipulas
6. San Marcos, Pajapita

7.2 MATERIALES:

7.2.1 MEDIOS DE CULTIVO:

- Agar Mueller Hinton
- Tripticasa soya

7.2.2 EQUIPO Y CRISTALERÍA:

- Tubos de ensayo
- Cajas de Petri descartables
- Mechero Bunsen
- Incubadora
- Autoclave
- Asa bacteriológica



- Guates y mascarilla
- Frascos de vidrio oscuro
- Pipeta volumétrica calibrada
- Baño de agua
- Beakers
- Probetas graduadas
- Estufa eléctrica
- Balanza analítica
- Centrifugadora
- Campana de flujo laminar
- Cámara Digital
- Microscopio
- Porta y Cubreobjetos
- Parafina
- Potenciómetro
- Agitador magnético
- Espectrofotómetro
- Mufla o incinerador
- Crisoles
- Equipo HPLC

7.2.3 REACTIVOS:

- Ácido acético
- Anhídrido acético
- Ácido sulfúrico
- Agua desmineralizada
- Glicerol
- Estándar de Hidroximetilfurfural
- Hidróxido de sodio
- Solución amortiguadora de acetato

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

7.3 DISEÑO EXPERIMENTAL:

Unidad Experimental:

Mieles de *Melipona beecheii* de los departamentos de Chiquimula, Guatemala, San Marcos, Santa Rosa, Petén y el Quiché.

Unidad Muestral:

Seis muestras de miel de *Melipona beecheii*, cada una correspondiente a los departamentos de Guatemala seleccionados por conveniencia.

Variable Independiente:

Miel de *Melipona beecheii*.

Variable de Respuesta:

Actividad antibacteriana de la miel de *Melipona beecheii*.

Características físico-químicas de la miel de *Melipona beecheii*.

Familias del recurso floral utilizado por las abejas para la obtención de polen.

Distribución Temporal:

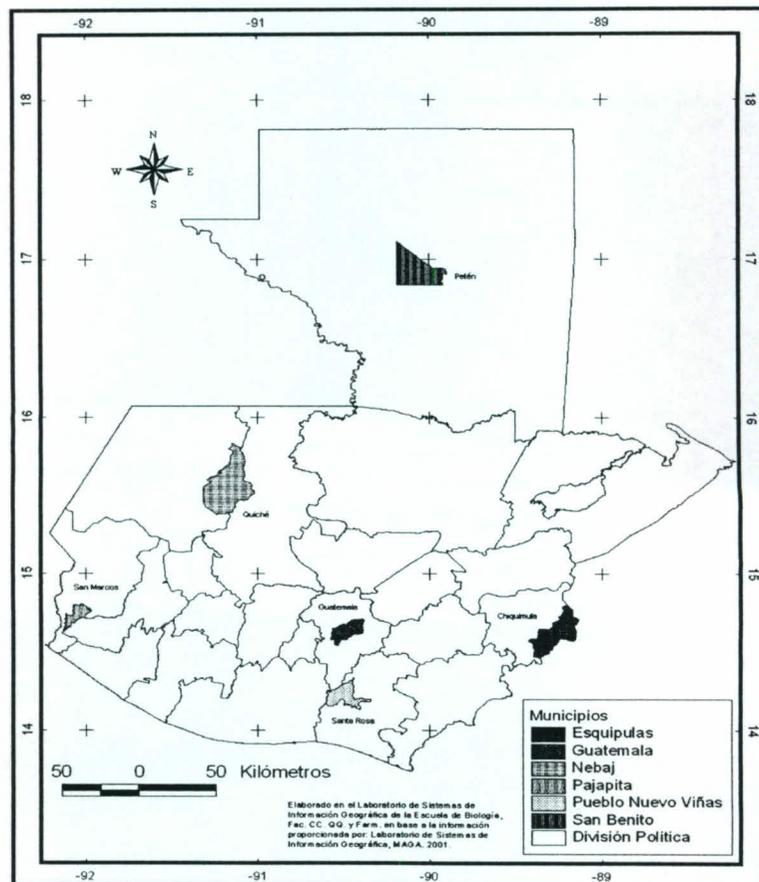
Colecta de mieles de enero a junio del año 2004.

Distribución Espacial:

Colecta de mieles en los siguientes seis departamentos de Guatemala:

- Petén, San Benito.
- Nebaj, Quiché.
- Pueblo Nuevo Viñas, Santa Rosa.
- Guatemala, Guatemala
- Esquipulas, Chiquimula.
- San Marcos, Pajapita

Mapa Político de Guatemala



7.4 METODOS:

7.4.1 Colecta de las muestras de miel:

Las muestras de miel de San Marcos, Esquipulas y Santa Rosa fueron compradas a meliponicultores, de estas regiones, quienes venden la miel que castran cada principio de año, de colmenas que mantienen en troncos. La forma en que castran sus colmenas es exprimiendo los potes de miel con las manos, extrayendo la miel y colándola con una manta para retirar material extraño. La miel del departamento de Guatemala, se obtuvo, durante el traslado de una colmena de tronco a caja, en el Meliponario Experimental ubicado en el Museo de Historia Natural, zona 10. Se utilizó una jeringa para extraer la miel de los potes y se almacenó en un frasco limpio. Las muestras de miel de Quiché y Petén fueron donadas para este estudio y no se conoce el procedimiento de extracción. Todas las muestras de miel se mantuvieron cubiertas, para evitar la exposición lumínica que altera los componentes de la miel y en refrigeración a 4 °C para evitar fermentación. La colecta de miel se realizó de febrero a junio del 2004.

7.4.2 Determinación de las características físico-químicas de la miel

Para el análisis de las características físico-químicas de la miel se utilizó el manual "Harmonised methods of the International Honey Commission (Bogdanov 2002). Las pruebas fisicoquímicas realizadas fueron: hidroximetilfurfural, cenizas, pH, humedad y acidez (anexo 1), realizadas con la colaboración de la Escuela de Química quien brindó instalaciones, materiales y asesoría para la realización de las mismas.

7.4.3 Determinación del Recurso Floral

El recurso floral presente en las muestras de miel fue determinado empleando análisis melisopalinológicos (Sánchez 2001). Estos consisten en una acetólisis para muestras de polen en mieles (anexo 2). La preparación de la mayoría de láminas fijas fue realizada en la Universidad de El Salvador y la mayor parte del recurso floral fue identificada en el Laboratorio de PROMABOS (Programa Amigos del Bosque) en El Salvador, con la ayuda de la Ing. Vilma Landaverde, trabajo realizado en junio del 2004. La muestra de miel de San Marcos fue analizada en Guatemala, realizando la acetólisis en la Escuela de Química y preparando láminas fijas en el Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la USAC.

7.4.4 Determinación de la efectividad antibacteriana

Para la determinación de la efectividad antibacteriana de las muestras de miel se contó con el apoyo del Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica, quienes brindaron materiales y asesoría para la realización de las pruebas. La metodología empleada para determinar la actividad antibacteriana de la miel fue una adaptación de la metodología empleada para evaluar extractos vegetales que se encuentra en el Manual de Procedimientos del Proyecto Biodiversidad del Departamento de Citohistología (anexo 3).

7.4.5 Análisis de resultados

Para conocer la procedencia polínica y las características físico-químicas de las seis muestras de miel, se emplearon tablas para la presentación de los resultados obtenidos.

Para determinar si las muestras de miel utilizadas presentaron actividad antibacteriana, los datos de inhibición y/o no inhibición al 10% de concentración, fueron sometidos a una prueba binomial, donde

$n = 8$ (número de réplicas). $\alpha = 0.05$.

Hipótesis nula: La miel no tiene efecto inhibitorio.

Hipótesis alterna: La miel si tiene efecto inhibitorio.

Hipótesis alterna: $p < 0.5$ Hipótesis alterna: $p > 0.5$

Solo un resultado podía ser negativo para rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alterna y con esto concluir que la miel de *Melipona beecheii* utilizada sí presenta actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *in vitro*.

8. RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS FISICOQUIMICAS DE MIEL DE *MELIPONA BEECHEII*

ACIDEZ Y PH

Como indica la tabla 2, el valor de pH promedio de las muestras de miel de *Melipona beecheii* es de 4.07 con rangos entre 3.80 a 4.44. La acidez promedio de las muestras de miel es de 57.171 meq/100 g de miel, la miel de Petén fue la que presentó menor acidez (28.084 meq/100 g de miel) y la de Chiquimula mayor acidez (90.27 meq/ 100 g de miel).

Tabla 2. Valores de pH y acidez determinados en mieles de *Melipona beecheii*

Muestra de miel	pH	Acidez (meq/100 g miel)
Chiquimula	3.80	90.27
Peten	4.44	28.084
Santa Rosa	4.03	49.147
Guatemala	4.27	39.117
Quiché	3.95	54.162
San Marcos	3.95	82.246
Media	4.07	57.171
Desviación	0.236	24.371
Rango	3.80-4.44	28.084-90.27

CENIZAS

En la tabla 3 se presenta el contenido de cenizas en las muestras de miel de *Melipona beecheii*, valores entre 0.105-0.210 g en 100 g de miel.

Tabla 3. Contenido de ceniza en muestras de miel de *Melipona beecheii*

Muestra de miel	Cenizas g/100g miel
Chiquimula	0.105
Santa Rosa	0.150
Quiché	0.140
San Marcos	0.165
Petén	0.210
Guatemala	0.195
Media	0.16
Desviación	0.04
Rango	0.10-0.21

HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)

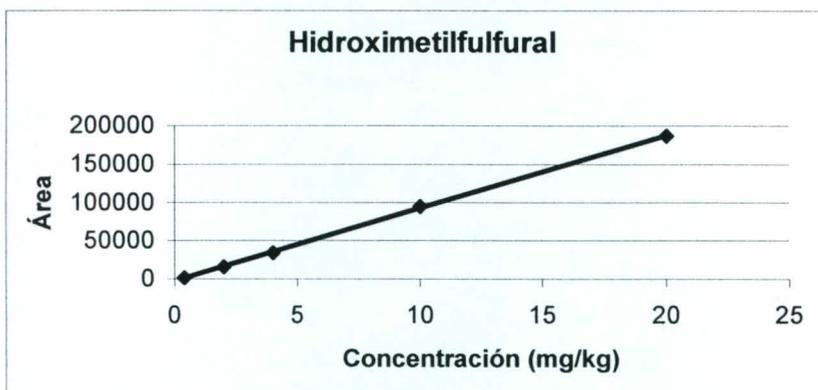
Curva de calibración de la solución de Hidroximetilfurfural

Se realizó una curva de calibración para la solución estándar de hidroximetilfurfural, empleando el Método de HPLC (High Performance Liquid Chromatography), cuya ecuación de la recta es la siguiente:

$$Y = 9493.9X - 2325.1$$

$$R^2 = 0.9998$$

Grafica 1. Curva de calibración de la solución estándar de hidroximetilfurfural



Contenido de Hidroximetilfurfural en muestras de miel

El contenido de hidroximetilfurfural en las muestras de miel fue determinado empleando los valores de área indicados en la cromatografía líquida para las seis muestras de miel, estos valores se presentan en la tabla 4. Los valores de área de la cromatografía líquida sustituyen la X en la curva de calibración de la solución estándar del HMF para obtener los valores de HMF en las muestras de miel.

Tabla 4. Valores de Hidroximetilfurfural en muestras de miel *Melipona beecheii*

Muestra de miel	Área de la curva (x)	HMF (mg/kg)
Chiquimula	14376	1.759
San Marcos	620	0.310
Santa Rosa	274	0.273
Guatemala	657	0.314
Quiché	220	0.268
Petén	691	0.317
	Media	0.540
	Desviación	0.600
	Rango	0.273-1.759

En la tabla 4 se presentan los valores de hidroximetilfurfural calculados para las seis muestras de miel de *Melipona beecheii*. El valor promedio de hidroximetilfurfural en las muestras de miel fue de 0.540 mg/kg de miel, 5 muestras de miel se encuentran por debajo de la media, siendo la miel de Chiquimula la que sobrepasa éste valor al presentar 1.759 mg/kg de hidroximetilfurfural.

PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS

Determinación de la Actividad antibacteriana:

Las pruebas de actividad antibacteriana de las seis muestras de miel de *Melipona beecheii* a una concentración del 10% demostraron que éstas son efectivas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *in vitro*. Se realizaron ocho réplicas siendo todas positivas a ésta concentración ($p = 0.0039$), aceptando la hipótesis planteada de que por lo menos una muestra de miel presenta actividad antibacteriana.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria de la miel se realizaron diluciones entre los intervalos de 0.625% a 10%, siendo todas efectivas al 5% y el 50% de la mieles fueron efectivas al 2.5%.

Tabla 7. Prueba de Actividad antibacteriana de miel de *Melipona beecheii*

+ = no crecimiento de *S. aureus* Si actividad antibacteriana - = si crecimiento de *S aureus* No actividad antibacteriana

Muestra de miel	Concentración				
	10%	5%	2.5%	1.25%	0.625%
Chiquimula	+	+	-	-	-
Guatemala	+	+	+	-	-
Santa Rosa	+	+	+	-	-
San Marcos	+	+	-	-	-
Quiché	+	+	+	-	-
Petén	+	+	-	-	-

En la tabla 8 se presentan las concentraciones mínimas inhibitorias de las seis muestras de miel de *Melipona beecheii* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se puede observar que las mieles de Guatemala, Santa Rosa y Quiché son efectivas a menor concentración que las otras tres muestras de miel.

Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria de mieles de *Melipona beecheii*

Muestra de miel	Concentración mínima inhibitoria
Chiquimula	5.0%
Guatemala	2.5%
Santa Rosa	2.5%
San Marcos	5.0%
Quiché	2.5%
Petén	5.0%

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

ANÁLISIS MELISOPALINOLÓGICOS

En la tabla 9 se presentan las familias vegetales presentes en las muestras de miel de *Melipona beecheii*, se identificaron 20 familias vegetales en las seis muestras de miel. Las mieles de Santa Rosa y Guatemala presentaron mayor diversidad de recurso vegetal con 11 familias vegetales en su composición polínica.

Tabla 9. Recurso floral en muestras de miel

Familia	Santa Rosa	Guatemala	Quiché	San Marcos	Petén	Chiquimula
Melastomataceae	X	X	X	X	X	X
Myrtaceae	X					
Asteraceae	X	X	X	X	X	X
Rutaceae	X		X			
Bignoniaceae	X				X	
Bromeliaceae	X					
Cochlopermaceae	X					
Hammamelidaceae		X				
Malvaceae	X				X	X
Tiliaceae	X	X	X			
Annonaceae	X			X		
Celastraceae		X				
Fagaceae		X	X			
Fabaceae	X	X				
Malphiaceae		X				
Solanaceae		X	X	X	X	X
Sterculiaceae		X		X	X	
Clethraceae			X			
Euphorbiaceae					X	
Mimosaceae		X				
Total	11	11	7	5	7	4

9. DISCUSION

CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS

Las cenizas representan el residuo inorgánico presente en las mieles (Vit *et al.* 1994). En este estudio las cenizas de las muestras de miel de *Melipona beecheii* analizadas presentaron un valor promedio de 0.16 g en 100 de miel. Valores extremos se observaron en las muestras de Petén con 0.210 g / 100 g de miel y Chiquimula con 0.105 g / 100 g de miel. Para este estudio los valores de cenizas en la miel de *Melipona beecheii* se encuentran entre 0.105-.210 g/100 g de miel, valores que se encuentran entre el rango que presenta la miel de *Apis mellifera* (0.04- 0.58 g/100 g de miel).

Esto parece indicar que la miel de *Melipona beecheii* no difiere de la miel de *Apis mellifera* en ésta característica fisicoquímica. Estudios con el género *Melipona* en Venezuela han determinado valores de 0.02 a 0.4 g de cenizas/100 g de miel (Vit *et al.* 1994), valores parecidos a los obtenidos en éste estudio. El contenido de cenizas es vinculado con la abundancia del recurso floral presente en las muestras de miel, por lo que se recomienda realizar análisis para comparar regiones fitogeográficas, sin embargo para este estudio no fue cuantificada la abundancia del recurso polínico.

La humedad de las mieles nos indica la cantidad de agua que éstas contienen. La miel de *Apis mellifera* presenta valores entre 14.9-19.0 g/100 g de miel (Vit *et al.* 1994). La miel de meliponinos se caracteriza por presentar valores altos de humedad, y la miel de género *Melipona* oscila entre los 22.9 a 31.5 g/100 g de miel (Vit *et al.* 1998). La humedad determinada en las muestras de miel de *Melipona beecheii* de Guatemala se encuentra entre 23.6 a 23.8 g/100 g de miel, lo cual sugiere que no importando el origen de la muestra de miel la cantidad de agua no difiere ampliamente.

Comparado con el valor de humedad de la miel de *Apis mellifera* observamos que la miel de *Melipona beecheii* presenta valores más altos de humedad que ésta miel, por lo que debe ser considerada un tipo de miel distinta a la producida por *Apis mellifera*.

Además debe mencionarse que las mieles con mayor cantidad de agua presentan mayor probabilidad de fermentación y mayor riesgo de contaminación con organismos oportunistas como hongos y algunas bacterias (López 1997). Es posible que la miel de meliponinos, la cual presenta mayor cantidad de agua en comparación con la miel de *Apis mellifera*, posea otros compuestos que inhiban el crecimiento de organismos oportunistas.

El hidroximetilfurfural es un aldehído presente en la miel, formado por la presencia de azúcares invertidos, obtenidos por la hidrólisis ácida de estos azúcares (Estrada 1991). La cantidad de hidroximetilfurfural presente en las muestras de miel fueron 0.273 a 1.759 mg/ kg valores bajos al ser comparados con los valores que presenta la miel del género *Melipona* de Venezuela, la cual presenta valores de 0.4 a 31.6 mg/kg. El hidroximetilfurfural es vinculado con un mayor tiempo de almacenamiento y exposición lumínica, los cuales aumentan los valores de éste aldehído (Villena & Bicudo 1999). Para las muestras de miel de *Melipona beecheii* empleadas para este estudio puede decirse que los valores bajos de Hidroximetilfurfural se deben a que las muestras fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C y sin exposición lumínica.

El pH de las muestras de miel se encuentra entre 3.8 a 4.44, lo cual nos indica que las mieles presentan pH ácido. La acidez de las muestras se encuentra entre los 28.084 a 90.27 meq/ 100 g de miel. Las muestras de mieles con los valores más altos de acidez fueron Chiquimula y San Marcos con valores mayores a 80 meq/100 g de miel. Si observamos los valores de pH, la variación entre los datos es pequeña ($s=0.236$), sin embargo la variación entre los datos de acidez es mayor ($s= 24.371$).

Esto indica que si se utiliza el pH para evaluar cualidades de la miel de meliponinos, no sería posible identificar diferencias entre muestras de miel de meliponinos. Sin embargo un análisis de acidez, por medio de una titulación, sí permite observar diferencias entre distintas muestras, aunque estas diferencias no sean muy significativas.

Ambas pruebas son relativamente sencillas, sin embargo determinar el pH de una muestra implica utilizar un potenciómetro, equipo que puede ser de difícil acceso. Por lo que una titulación con solución básica es una forma sencilla y accesible de determinar la acidez en muestras de miel.

Es importante señalar, que durante la titulación, las muestras de Chiquimula y San Marcos consumieron mayor cantidad de solución básica (>4.0 ml) para alcanzar el pH 8.3 necesario para el cálculo de acidez, en comparación con las otras muestras de miel que emplearon entre 1.40-2.70 ml. Esto parece indicar que ambas muestras presentan uno o varios compuestos que reaccionaron con la solución básica, evitando que cambiara el pH rápidamente (*Com pers Cobar* 2005) y que para esta investigación se desconoce

El hidroximetilfurfural es un compuesto formado por la transformación de azúcares en medio ácido (Estrada 1991), lo que hace suponer que la alta acidez presente en las mieles de Chiquimula y San Marcos, puede favorecer la formación del compuesto. Sin embargo solo la miel de Chiquimula presentó un valor alto de hidroximetilfurfural en comparación con las otras muestras de miel.

Esto nos indica que la acidez no es el factor principal que interviene en la formación del hidroximetilfurfural, sino que la cantidad de azúcares en las muestras es determinante en esta reacción. La cantidad de azúcares no fue calculada para este análisis, pero es probable que la muestra de miel de Chiquimula presente mayor cantidad de azúcares que la miel de San Marcos y debido a esto, presentó mayor cantidad de hidroximetilfurfural.

Los parámetros de acidez, humedad, hidroximetilfurfural y cenizas han sido propuestos como estándares de calidad para la miel de abejas sin aguijón. Entre estos estándares se incluyen normas para el género *Melipona*, presentados a la Comisión Internacional de la Miel para la regulación de la comercialización de ésta miel (Vit 2004). Comparando los valores obtenidos en este estudio con los propuestos, se puede observar que las mieles de los departamentos de Petén, Quiché, Guatemala y Santa Rosa no sobrepasan los valores máximos propuestos (anexo 4).

Esto indica que de ser aprobada la propuesta por la Comisión Internacional de la Miel, es posible que las mieles de estos departamentos puedan ser comercializadas. Las mieles de los departamentos de Chiquimula y San Marcos presentaron valores altos de acidez, excediéndose más del 20% del valor propuesto por Vit *et al.* 2004. De demostrarse que la miel de estos lugares no cumple con esta característica fisicoquímica se manifestaría la necesidad de determinar estándares de calidad para las mieles de *Melipona* y otras abejas nativas sin aguijón en nuestro país. Con el objetivo de que los parámetros propuestos a la Comisión Internacional de la Miel sean modificados e incluyan rangos más amplios para regular la calidad de la miel del género *Melipona* de toda la región mesoamericana en la que se encuentra presente.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Las pruebas de actividad antibacteriana realizadas a las muestras de miel de *Melipona beecheii* resultaron ser efectivas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *in vitro*, a concentraciones bajas. Se determinó que todas las muestras eran efectivas al 5% y el 50% de éstas mieles aún presentaban actividad antibacteriana al 2.5 %. Por lo que para este trabajo se determina que la miel de *Melipona beecheii* es efectiva contra *Staphylococcus aureus* en el rango de 2.5 a 5% de concentración.

Cabe mencionar que el grupo de mieles que presentó actividad al 2.5 % fue evaluado a concentraciones menores, que iban del 2.5 al 0.625% de dilución, en donde se observó que para la miel del departamento de Guatemala, de las tres réplicas realizadas dos fueron inhibidas al 1.25% y solo una no resultó efectiva. Dado que las tres réplicas debían resultar efectivas contra *Staphylococcus aureus* para determinar la concentración mínima inhibitoria, se concluyó que para esta muestra de miel la concentración menor a la que es efectiva es de 2.5%. Esto denota la importancia de realizar más análisis para la miel de este departamento y determinar la concentración mínima inhibitoria de la miel contra esta bacteria la cual puede ser menor a 2.5%.

La actividad antibacteriana de la miel de *Apis mellifera* ha sido relacionada con diversos factores, entre estos la osmolaridad, la cual esta determinada por la concentración de azúcares presentes en la miel que impiden el crecimiento bacteriano (Molan 1992). Sin embargo la actividad antibacteriana de la miel a valores del 10% de concentración (dilución) elimina la osmolaridad como el responsable de esta actividad. Para las seis muestras de miel la actividad se mantuvo a concentraciones menores, entre el rango de 2.5 a 5%, lo que sugiere que existen otros factores vinculados con la actividad antibacteriana de la miel de *Melipona beecheii*.

Se ha mencionado que la acidez de la miel es otro factor que determina la actividad antibacteriana (Molan 1992), por lo que las mieles con mayor acidez presentan mayor actividad contra el crecimiento de bacterias. Dada esta condición, las mieles de los departamentos de Chiquimula y San Marcos debían ser más efectivas por presentar los valores más altos de acidez, 90.27 y 82.246 meq/100 g de miel respectivamente. Sin embargo las mieles más efectivas fueron las provenientes de los departamentos de Santa Rosa, Guatemala y Quiché las cuales presentaron valores menores de acidez (39.117-54.162 meq/100 g de miel). Esto nos indica que para este estudio la acidez no resultó ser un factor determinante de mayor actividad antibacteriana de la miel.

Popularmente se cree que la miel fermentada, la cual presenta valores altos de hidroximetilfurfural (HMF), es más efectiva contra enfermedades respiratorias (Vit *et al.* 2004). Sin embargo para el caso de *Staphylococcus aureus*, bacteria asociada con problemas de la piel, las mieles con mayor cantidad de éste compuesto (Chiquimula y San Marcos) no resultaron más efectivas, por lo que para este estudio una mayor cantidad de este compuesto no favorece la actividad antibacteriana de las muestras de miel analizadas.

Otros compuestos vinculados con la actividad antibacteriana de la miel son el peróxido de hidrógeno, flavonoides y la presencia de sustancias antibacterianas que aporta el recurso floral empleado por las abejas (Molan 1992; Vit 1994). En el Seminario de Inocuidad de la Miel realizado en Guatemala en el 2003, se planteó la importancia de no emplear antibióticos de forma preventiva para el cuidado de las colmenas de *Apis mellifera* para controlar diversas enfermedades, ya que trazas de estos antibióticos son encontrados en la miel.

Se ha vinculado la actividad antibacteriana de la miel con la presencia de antibióticos. Sin embargo *Melipona beecheii* es una abeja cultivada de forma artesanal en donde el meliponicultor no emplea químicos para el cuidado de sus colmenas. Existe una alta probabilidad que las muestras de miel utilizadas no presentan residuos de éste tipo, por lo que la presencia de antibióticos en la miel no es el factor que determina la actividad antibacteriana de la miel de *Melipona beecheii* de este estudio.

Las abejas sin aguijón, en donde se encuentra *Melipona beecheii*, almacenan su miel en potes o cántaros, los cuales son exprimidos por los meliponicultores para extraer la miel. Se ha mencionado que exprimir los potes de miel le confiere mayor actividad antibacteriana (Coms *pers Vit* 2004), sin embargo para este estudio una de las mieles que presentó mayor actividad antibacteriana fue la miel del departamento de Guatemala, la cual fue obtenida extrayéndola con un succionador.

Puede considerarse que el exprimir los potes de miel no confiere mayor actividad antibacteriana, o que la miel que fue succionada hubiera presentado mayor actividad antibacteriana si hubiera sido extraída exprimiendo los potes. Ante esto se hace necesario evaluar la miel obtenida de ambas formas para determinar si ésta condición influye en la actividad antibacteriana.

Staphylococcus aureus es una bacteria resistente a diversos antibióticos (Pelczar, et al. 1997) y en otros estudios ha demostrado resistencia a la miel de otra abeja sin agujón, *Tetragonisca angustula* (Demera & Esther 2004). En Guatemala la miel de ésta abejas es empleada para el tratamiento de afecciones oculares de forma popular y la miel de *Melipona beecheii* para el tratamiento de afecciones dermatológicas. Esto nos indica que el conocimiento popular en Guatemala reconoce la actividad de las diversas mieles de abejas sin agujón para distintas afecciones. Debido a que las muestras de miel de *Melipona beecheii* resultaron efectivas contra esta bacteria debe estudiarse su uso como una alternativa al empleo de antibióticos para afecciones causadas por esta bacteria.

RECURSO FLORAL

Se determinó la presencia de 20 familias y 36 especies de plantas que visita *Melipona beecheii* en Guatemala (anexo 5). Todas las muestras analizadas presentaron al menos 5 familias vegetales distintas, por lo que a estas mieles pueden denominárseles “mieles poliflorales” (Sánchez 2001). El análisis melisopalínológico nos indica que las mieles de Santa Rosa, Guatemala, Quiché y Petén presentan mayor número de familias vegetales, tres de las cuales con actividad antibacteriana al 2.5% lo que sugiere que pueda existir una relación entre mayor actividad antibacteriana de la miel y mayor diversidad de recurso floral, lo cual debe ser evaluado en posteriores estudios.

Un artículo publicado por Ramalho *et al.* en 1990, presenta un listado de recursos empleados por abejas sin aguijón de los género *Trigona* y *Melipona* en habitats neotropicales. Este autor reporta que las abejas del género *Melipona* visitan los recursos florales determinados en este estudio. Sin embargo las familias Clethraceae, identificada en la muestra de miel de Quiché, y Rutaceae, en las muestras de Santa Rosa y Quiché, eran reportadas como recursos visitados por abejas del género *Trigona* por lo que con este estudio, puede decirse que también son visitados por abejas del género *Melipona*.

Se ha señalado que el recurso floral determina las cualidades de la miel, y que participa en la actividad antibacteriana. En esta investigación las mieles con mayor actividad antibacteriana presentaron como familias exclusivas Cochlopermaceae, Myrtaceae, Bromeliaceae, Cochlopermaceae, Hammamelidaceae, Rutaceae, Celastraceae, Sterculiaceae y Clethraceae, lo que sugiere que estas plantas pueden estar vinculadas con la actividad antibacteriana de la miel.

El análisis melisopalinológico de las muestras de miel permitió identificar dos plantas medicinales como recurso empleado por las abejas. Siendo éstos *Cochlospermum sp.* empleado para el tratamiento de afecciones del riñón e hígado y para facilitar el parto de niños, y *Citrus aurantifolia*, a la cual se le atribuye propiedades medicinales contra diversos gérmenes (Standley & Steyermark 1946). Las familias Rutaceae, Sterculiaceae y Myrtaceae también son empleadas con fines medicinales en Guatemala y son tema de investigación en la actualidad (Martinez 1995).

10. CONCLUSIONES

- Este estudio es de gran importancia ya que presenta la primera información relacionada con las características fisicoquímicas y antibacterianas de la miel de *Melipona beecheii* en nuestro país.
- Para este estudio, La miel de *Melipona beecheii* presenta como características fisicoquímicas: pH de 4.07, acidez de 57.17 meq/100 g de miel, cenizas 0.17 g /100 g de miel, 0.55 mg de HMF/Kg de miel y humedad de 23.67 g/100 g de miel.
- Analizar las mieles de meliponinos de cada país es de gran importancia, ya que como se manifiesta en este estudio, las características fisicoquímicas difieren de valores obtenidos en otros países. Es necesario definir estándares para el control de calidad de la miel de meliponinos en cada país.
- Las muestras de miel de *Melipona beecheii* utilizadas en este estudio son efectivas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *in vitro* a concentraciones del 5 al 2.5%, demostrando que esta miel presenta actividad antibacteriana, vinculada con las propiedades terapéuticas atribuidas popularmente para el tratamiento de afecciones dermatológicas.
- Para este estudio se descarta la acidez, osmolaridad y cantidad de hidroximetilfurfural como responsables de la actividad antibacteriana de la miel de *Melipona beecheii*.
- Este estudio señala que existe una relación entre la diversidad del recurso vegetal presente en las muestras de miel y una mayor actividad antibacteriana de la miel de *Melipona beecheii*.

- Los análisis melisopalinológicos realizados a la miel de *Melipona beecheii* nos indica que esta especie visita por lo menos 20 familias y 36 especies de plantas en nuestro país. La diversidad de recurso polínico identificado en las muestras clasifica las mieles como poliflorales.
- Esta investigación puede ser empleada para impulsar la crianza de abejas sin aguijón, dado que la mayoría de mieles analizadas cumplen con los parámetros propuestos como estándares de calidad para la miel de *Melipona* propuestos por Vit *et al* 2004.
- Este estudio es un aporte para la posterior validación de la actividad antibacteriana atribuida popularmente a la miel de esta abeja.

11. RECOMENDACIONES

- Realizar la caracterización fisicoquímica y antibacteriana de la miel de *Melipona beecheii* con un mayor número de muestras, que permita realizar análisis estadísticos y dar validez a los datos. Así mismo deben estudiarse las mieles de otras abejas sin aguijón de Guatemala para conocer las especies con mayor potencial para la comercialización de la miel.
- Diseñar estudios de investigación en los que se evalúe la relación entre las características fisicoquímicas, el recurso polínico y la actividad antibacteriana de la miel dependiendo la región geográfica de la cual proviene.
- Es necesario realizar estudios en los que se plantee como objetivos determinar las cualidades de la miel que se encuentren relacionados con la actividad antibacteriana de la miel.
- Se recomienda impulsar la crianza de abejas sin aguijón, como *Melipona beecheii* la cual visita gran número de plantas participando en los procesos de polinización de plantas silvestres y cultivadas.
- Caracterizar otros productos de la colmena de abejas sin aguijón en Guatemala, como el propóleo, el cual es señalado como un producto con mayores propiedades terapéuticas que la miel (Asis 1996).
- Dada la actividad antibacteriana de la miel determinada en este estudio, se sugiere dársele un valor agregado a la miel blanca producida por *Melipona beecheii*. Lo cual resultaría de beneficio para los meliponicultores de áreas rurales, quienes obtienen cantidades de miel menores en comparación con la producción de *Apis mellifera*.

12. REFERENCIAS

1. Asís, M. 1996. Apiterapia para todos: Cómo usar los 7 productos de la colmena para curar. Editorial Científico-Técnica. La Habana, Cuba. 194 p.
2. Amador, M. 1991. Abejas Nativas y Producción de Miel. Aportes. No. 74. Costa Rica. 10-12 p.
3. Ayala, R. 1999. Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera; Apidae: Meliponini). Folia Entomológica. México. 106:1-123 p.
4. Bogdanov, S. P. Martin. C. Lullmann, et al. 2002. Harmonised methods of the International Honey Commission. Suiza. 54 pp.
5. Cobar, O. 2005. Comentario Personal. Instituto de Investigaciones de Químicas Biológicas. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
6. De Jong, H. 1999. Land of Corn and Honey. The keeping of stingless bees (meliponiculture) in the ethno-ecological environment of Yucatán (México) and El Salvador. Universidad Utrecht, Holanda.
7. Demera, J. & Angert, E. 2004. Comparison of the Antimicrobial Activity of Honey Produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* L. from Different Phytogeographic Regions of Costa Rica. Apidologie Vol. 35 Pag. 411-417.
8. Enríquez, E, Yurrita, C, Aldana, H, Ocheita, J, Jáuregui, R, & P. Chau. 2004. Desarrollo de la Crianza de Abejas sin Aguijón -Meliponicultura- para el Aprovechamiento y Comercialización de sus Productos, como

una Alternativa Económica Sustentable en el Área de El Trifinio, Chiquimula. Plan de Apoyo a la Reconversión Productiva Agroalimentaria -PARPA-AGROCYT-. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación -MAGA-. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

9. Enríquez, E. 2005 Comentario Personal. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
10. Estrada, A. 1991. Determinación de Hidroximetilfurfural en mieles comerciales de Guatemala. Guatemala. Universidad de San Carlos. 32p. (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia)
11. 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
12. Grajales-Conesa, J., Rincón-Rabanales, M., Guzmán-Díaz, M. & Vandame, R. 2003. Propiedades físicas, químicas y antibacterianas de mieles de *Scaptotrigona mexicana* de la región Soconusco, Chiapas, México. III Seminario Mesoamericano sobre Abejas sin Aguijón. Tapachula, Chiapas, México.
13. Landaverde, V. *et al.* 2003. Dominancia temporal de polen de plantas nectapolíniferas por *Melipona beecheii* en el Salvador y de plantas políniferas por *Tetragonisca angustula* y *Melipona beecheii* en Costa Rica. III Seminario Mesoamericano sobre Abejas sin Aguijón. Tapachula, Chiapas, México.

14. López, G. 1997. ¿Cómo cura la miel? Equipo revista Integral. Manuales Integral No. 7. Barcelona. 96p.
15. Manual de Procedimientos del Proyecto Biodiversidad OEA. Departamento de Citohistología. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
16. Martínez, E; Cuadriello, A; Tellez, O; Ramirez, E; Sosa, M; Melchor, J; Medina, M; Lozano, M. 1993. Atlas de las plantas y el polen utilizados por las 5 especies principales de abejas productoras de miel en la región de Tacana, Chiapas, México. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 105 p.
17. Martínez, J. 1995. Guatemala: Informe Nacional para la Conferencia Técnica Internacional de la FAO sobre los Recursos Filogenéticos. www.fao.org
18. Marroquín Juárez, A. 2000 Sistemática e historia natural de las abejas (Hymenoptera: Apoidea) de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 122p.
19. Molan, P. 1992. The Antibacterial Activity of Honey. Bee World. Vol. 73. Pág. 59-76.
20. Molan, P. 2001. Why Honey is Effective as a Medicine? Bee World. Vol. 82. Pág. 22-40.
21. Pelczar, M. Reid R. & E.C.S. Chan. 1997. Microbiología. 4ta. Edición. Trad. Capella, A. Y J. Zavala. Editorial McGraw-Hill. México.

22. Ramalho, M. Kleinert-Giovannini, A & VL. Imperatriz-Fonseca. 1990. Important bee plants for stingless bees (*Melipona* and *Trigonini*) and Africanized honeybees (*Apis mellifera*) in neotropical habitats: a review. *Apidologie*. Vol. 21. Pag. 469-488.
23. Roubik W, D. 1992. Ecology and natural history of tropical bees. Cambridge Tropical biology series. Cambridge University Press. United States. 514 p.
24. Sánchez C, L. 2001. Métodos Palinológicos, curso de capacitación al personal de PROMABOS. -CINAT-PARAM-UNA-UU. San Salvador, El Salvador. 15 p.
25. Santiesteban-Hernández. A., Cuadriello, J. y Loper, G. 2003. Comparación de Parámetros Físico-químicos de Miel de Abejas sin Aguijón y *Apis mellifera* de la Región del Soconusco, Chiapas, México. III Seminario Mesoamericano sobre Abejas sin Aguijón. Tapachula, Chiapas, México.
26. Villena, F. & L. Bicudo. 1999. Manual de análisis físico-químicas de mel. Sao Paulo: APACAME. 16p.
27. Villanueva, R., Roubik, D., Colli-Ucán, W. & Forsythe, S. 2003 La Meliponicultura, una Tradición Maya que se Pierde. III Seminario Mesoamericano sobre Abejas sin Aguijón. Tapachula, Chiapas, México, 6-8 de Noviembre del 2003.
28. Vit, P., S. Bogdanov., V. Kilchenmann. 1994. Composition of Venezuelan honeys from stingless bees (*Apidae: Meliponinae*) and *Apis mellifera* L. *Apidologie*. Vol. 25. Pág. 278-288.

29. Vit, P., M. Medina & E. Enríquez. 2004. Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, México and Venezuela. *Bee World* 85 (1).
30. Vit, P. Persano L. Marano M. & E. Salas. 1998. Venezuelan stingless bee honeys characterized by multivariate analysis of physicochemical properties. *Apidologie*. Vol. 29. Pag. 377-389.
31. Vit, P. 2005. Comentario Personal. Laboratorio de Apiterapia y Vigilancia Ambiental. Universidad de los Andes. Venezuela.
32. Walker, S. 2000. Microbiología. Traduc. Aguilar, T. McGraw-Hill Interamericana. México
33. White. W. 1971. Honey, Its Composition and Properties. *Beekeeping in the United States*. Agricultural Research service. United States Department of Agriculture. Washington. D.C. 147 pp.

13. ANEXOS

ANEXO 1

ANALISIS FISICOQUIMICOS

pH Y ACIDEZ:

Reactivos: Todos de calidad analítica. Agua destilada libre de dióxido de carbono, solución bufer para la calibración del potenciómetro a pH 3.7 (o 4) y 9.0.

Equipo: Potenciómetro graduado para unidades de 0.01, agitador magnético, bureta de 10 ml, 25 ml, o titulador automático. Beaker de 250 ml.

Procedimiento:

Calibrar el potenciómetro a 3.0, 7.0 y 9.0

Determinación: Asegurarse de que la miel no contenga material extraño. Disolver 10 g en 75 ml en agua en un beaker de 250 ml. Agitar empleando el agitador magnético, inmersa los electrodos en la solución y anote el pH. Titular con 0.1 M de hidróxido de sodio para un pH de 8.30.

El pH se reporta con dos decimales.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CENIZA:

Equipo: Crisol, estufa eléctrica para la preliminar evaporación, Horno eléctrico o mufla. Desecador a temperatura ambiente, balanza analítica.

Preparación de la muestra:

Pesar 5 a 10 g de la muestra (+ - 0.001 g) dentro del crisol. Después eliminar el agua en estufa eléctrica a temperatura moderada. Llevar a mufla e incinerar a una temperatura de 350 a 400 °C, calentar por lo menos una hora. En un desecador enfriar el plato y pesar, seguir quemando hasta que el peso sea constante.

Tomar datos:

Tomar el peso de la miel al inicio, del plato más la ceniza, el peso del plato solo. Calcular para 100 gramos de miel, expresando los resultados con dos decimales.

HIDROXIMETILFURFURAL (HPLC):

Reactivos:

Fase móvil (agua-metanol:90+10 por volumen ambos con cualidad HPLC)

Solución estándar: 5-hidroximetilfurfural-2-carbaldehído (HMF). 1, 2, 5 y 10 mg/l de solución acuosa, la cual debe ser preparada el día de uso.

Determinación del contenido estándar de HMF:

Construir la curva de calibración de la solución estándar empleando soluciones a distintas concentraciones del hidroximetilfurfural. Anotar los datos de área para cada concentración y luego graficar los datos. Obtener la ecuación de la recta.

Equipo:

Cromatógrafo líquido con detector UV e integrador.

Columna: Cualquiera con C 18 reverso fase material. ej. Hypersil ODS 5 micras, 125 * 4 m o 250 * 4 mm Membrana filtro de 0.45 micra (ej. Dynagard)

Procedimiento:

Preparación de mieles (libre de material extraño)

Determinación:

Pesar exactamente 10 gramos de la miel en un beaker de 50 ml, luego disolver la miel en 25 ml de agua y transferir cuantitativamente a un matraz de 50 ml. Diluir para 50 ml con agua, filtrar a través de una membrana (filtro) de 0.45 micras para obtener una muestra de solución lista para la cromatografía.

Condiciones para la cromatografía:

Correr a un rango de un ml por minuto, cantidad inyectada 20 microlitros de la muestra o solución estándar detección uv 285 nm, rango 0.2 AUPS.

Cálculos: El contenido de HMF de la muestra es calculada por comparación de las áreas de los picos de la muestra y la solución estándar, tomando dentro de un contador de la dilución. Hay una relación lineal entre las concentraciones y el área del pico del HMF. Los resultados son expresados en Mg/Kg con un decimal.

HUMEDAD:

La cantidad de agua en las muestras de miel se realiza de forma indirecta empleando el método de refractometría. Para esto se coloca una pequeña muestra de miel en el refractómetro y se realiza la lectura. Los datos obtenidos son comparados con la tabla Chataway para el cálculo de la cantidad de agua.

ANEXO 2

ACETÓLISIS PARA MUESTRAS DE POLEN EN MIELES (Sánchez, 2001)

De cada una de las seis muestras de miel colectadas, se coloca un poco de la muestra de miel en un beaker, luego se le agrega 40 ml de agua, se agita y se mezcla hasta homogenizar la solución. Posteriormente se divide la muestra en 2 tubos de ensayo identificados. Se preparan otras muestras por duplicado con igual volumen, y se centrifugan por 4 minutos a 3000 revoluciones por minuto. (r.p.m.), los tubos son decantados rápidamente.

Se llena uno de los duplicados con agua. Se homogeniza cada muestra y se adiciona al otro tubo un poco de muestra igualando volúmenes. Se centrifuga por 4 minutos a 3000 r.p.m. Se decanta de golpe, se adiciona a los tubos ácido acético y se centrifuga durante 4 minutos a 3000 r.p.m, posteriormente se vuelve a decantar la solución en un beaker rotulado para ácido acético en la campana de flujo laminar.

En la campana de flujo laminar se prepara la solución de acetólisis (9 partes de anhídrido acético más una parte de ácido sulfúrico, se añade el ácido sulfúrico al anhídrido acético lentamente gota a gota). Adicionar 5 ó 6 ml de esta mezcla a cada tubo y calentar los tubos por 6 minutos a 100° C en baño maría. La reacción óptima es un cambio de color a café oscuro (cuidando no sobrecalentar los tubos porque se corre el riesgo de una reacción violenta que la hace explotar).

Centrifugar por 4 minutos y decantar en el beaker que tiene el ácido acético. Llenar los tubos con agua desmineralizada centrifugar y decantar. Repetir éste último paso y preparar la solución de glicerol (50% glicerina + 50% agua). Llenar los tubos con glicerol (mantiene el polen fresco). Centrifugar y decantar en lavamanos dejando los tubos en posición vertical e invertidos, en una gradilla, los granos de polen quedan en el fondo de los tubos. Se colocan en estufa los tubos invertidos por 15-30 minutos a 60° C, para evaporar restos de agua. Se procede a fijar el polen en las láminas, utilizando glicerol para la colecta de polen de los tubos, se colocan en portaobjetos y se prepara la lámina fija con parafina. Se procede a realizar la identificación taxonómica de las familias de especies vegetales presentes en las muestras de miel utilizando claves palinológicas.

ANEXO 3

METODOLOGÍA PARA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MIEL

Preparación de Agar-Miel:

Se prepara tubos con 9.0 ml de agar Mueller Hinton. Se esterilizan y se dejan enfriar a 50° C. El agar se verte en en cajas de Petri estériles y se agrega 1.0 ml de la muestra de miel, agitando para homogenizar la mezcla, la concentración será del 10%. Se deja solidificar y se incuba a 36° C durante 24 horas, para comprobar su esterilidad. Se guardan en refrigeración hasta ser utilizadas.

Preparación del inóculo:

Primero debe de purificarse la bacteria de *Staphylococcus aureus* que será utilizada, por lo que en un tubo de ensayo con 8 ml de agar Mueller Hinton inclinado se inocula con la bacteria y se incuba por 24 horas a 36° C. Posteriormente se inocula una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 ml de caldo de Tripticasa soya y se incuba por 48 horas a 36° C. De la solución anterior se debe diluir 0.05 ml en 4.95 ml de solución salina estéril (dilución 1:100) y se siembra en caja de Petri.

Demostración de la actividad antibacteriana:

Inocular en las cajas con Agar-miel una asada de *Staphylococcus aureus* siguiendo el patrón de una plantilla, se realizarán cinco repeticiones. Se deja reposar durante 5-10 minutos y se incuban a 36° C durante 24 horas. El control negativo será 9 ml de agar Mueller Hinton mezclado con un ml de agua estéril.

Interpretación de los Resultados:

Si hay un crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo se considera una "actividad negativa".

Si no hay un crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo se considera una "actividad positiva"

Si se presentan microorganismos fuera de la inoculación se considera una "contaminación"

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima :

Si se determina en la fase anterior que si existe actividad positiva, se procederá a calcular la concentración inhibitoria mínima, para lo cual se prepara cajas cuadrilpalte con las siguientes diluciones de las mieles:

3.6 ml de agar + 0.4 de la solución de miel = 1.0 mg/ml

3.8 ml de agar + 0.2 de la solución de miel = 0.5 mg/ml

3.9 ml de agar + 0.1 de la solución de miel = 0.25 mg/ml

Un cuadrante con 4.0 ml de agar como control negativo.

Se inocula tres estrías en cada uno de los cuadrantes, luego se incuban durante 24 horas a 36° C. Y se determina el tipo de crecimiento bacteriano para concluir el tipo de actividad antibacteriana.

ANEXO 4

RESULTADOS DE MIELES DE GUATEMALA SEGÚN ESTANDARES DE CALIDAD SUGERIDOS (Vit et al. 2004l)

Tabla 10. Características fisicoquímicas de mieles de *Melipona beecheii*

Muestra de miel	HMF mg/kg max. 40.0	Cenizas g/100g miel max. 0.5	Humedad g/100g miel max. 30.0	Acidez meq/100g Max. 70.0	Ph
Chiquimula	1.8	0.1	23.8	89.9	3.80
San Marcos	0.3	0.2	23.8	82.2	3.95
Santa Rosa	0.3	0.2	23.6	49.2	4.02
Guatemala	0.3	0.2	23.6	39.1	4.27
Quiché	0.3	0.1	23.6	54.5	3.95
Peten	0.3	0.2	23.6	28.1	4.44

ANEXO 5

LISTADO DE RECURSO FLORAL PRESENTE EN MIEL DE
MELIPONA BEECHEII

Annonaceae

Crematosperma sp.

Asteraceae

Calea sp.

Vernonia patens (HBK)

Verbesina turbascensis (HBK)

Wedelia sp.

Sinclaria sp.

Vernonia sp.

Bignoniaceae

Tabebuia sp.

Bromeliaceae

Sp 1.

Celastraceae

Crossopetalum sp.

Clethraceae

Clethra sp.

Cochlospermaceae

Cochlospermum vitifolium Willd.

Euphorbiaceae

Sp. 1

Fagaceae

Quercus sp.

Hamamelidaceae

Liquidambar styraciflua L.

Fabaceae

Senna sp. 1

Senna sp. 2

Mimosaceae

Mimosa pudica

Malvaceae

Abutilon sp.

Malpighiaceae

Bunchosia sp.

Sp. 1

Melastomataceae

Tibouchina sp.

Miconia sp.

Myrtaceae

Syzygium jambos (L.) Alston

Eugenia sp

Rutaceae

Citrus aurantifolia (Christm.) Swingle

Citrus sp.

Solanaceae

Sp 1.

Solanum sp

Solanum arboreum

Solanum grandiflorum

Witheringia sp

Sterculiaceae

Waltheria sp

Tiliaceae

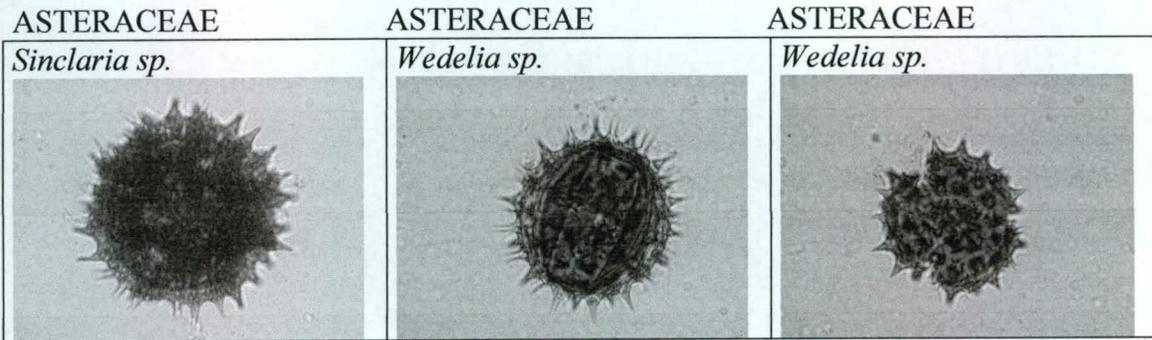
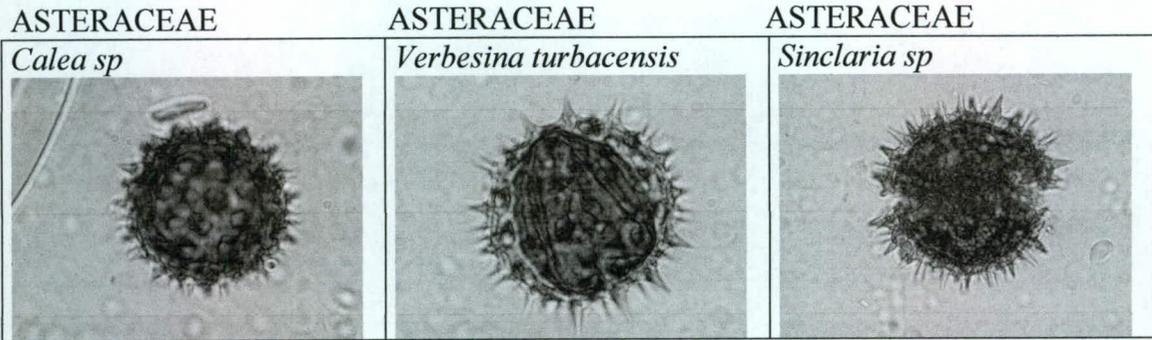
Heliocarpus sp.1

Heliocarpus sp.2.

Triumfetta sp

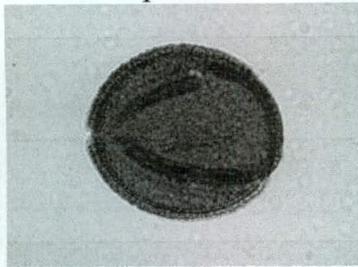
ANEXO 6

GRANOS DE POLEN IDENTIFICADO EN MUESTRAS DE MIEL



BIGNONIACEAE

Tabebuia sp



BROMELIACEAE

Sp 1.



CELASTRACEAE

Crossopetalum sp.



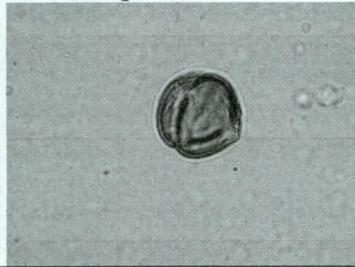
CELASTRACEAE

Crossopetalum sp



CLETHRACEAE

Clethra sp.



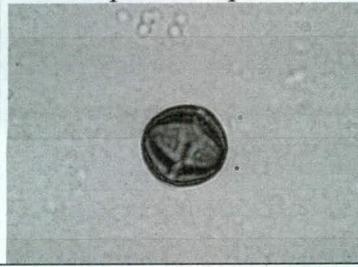
CLETHRACEAE

Clethra sp.



COCHLOSPERMACEAE

Cochlospermun sp.



COCHLOSPERMACEAE

Cochlospermun sp



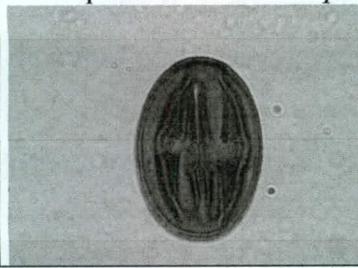
FABACEAE

Caesalpinioideae: *Senna sp.*



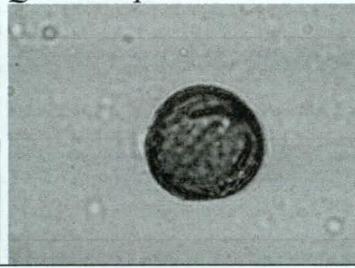
FABACEAE

Caesalpinioideae: *Senna sp*



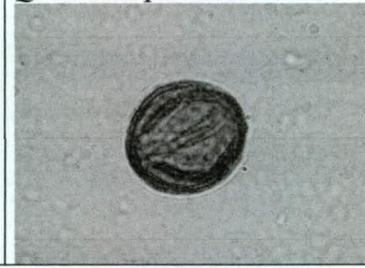
FAGACEAE

Quercus sp.



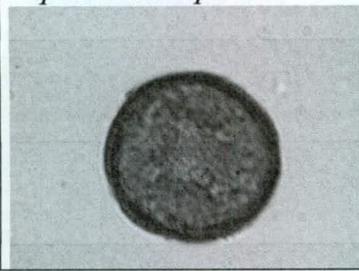
FAGACEAE

Quercus sp



HAMAMELIDACEAE

Liquidambar sp.



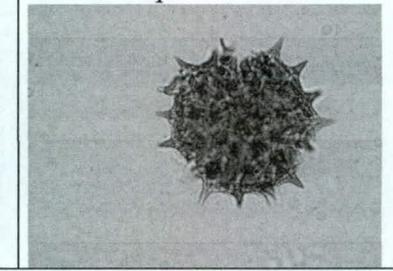
MALPIGHIACEAE

Malpighiaceae sp



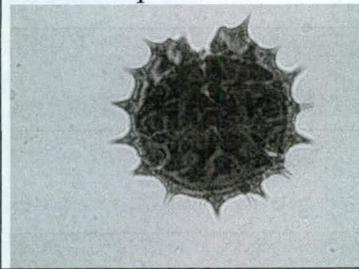
MALVACEAE

Abutilon sp



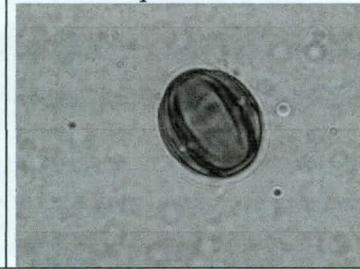
MALVACEAE

Abutilon sp.



MELASTOMATACEAE

Miconia sp.



MELASTOMATACEAE

Miconia sp.



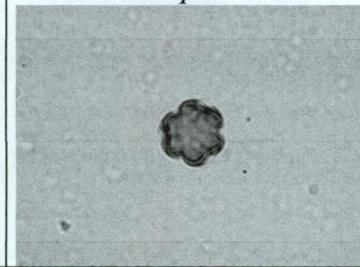
MELASTOMATACEAE

Miconia sp.



MELASTOMATACEAE

Tibouchina sp.



MIMOSACEAE

Mimosa pudica



MYRTACEAE

Syzygium jambos



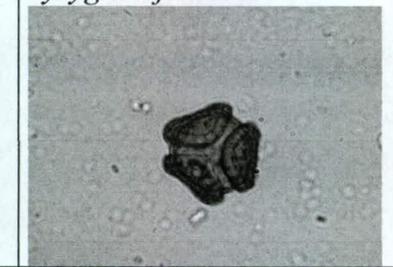
MYRTACEAE

Syzygium jambos



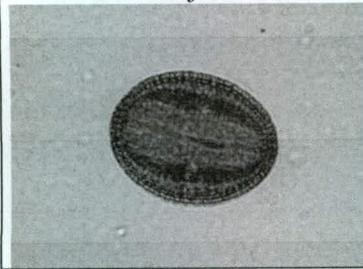
MYRTACEAE

Syzygium jambos



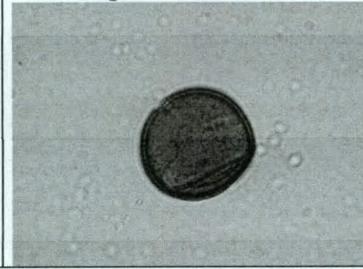
RUTACEAE

Citrus aurantifolia



RUTACEAE

Citrus sp.



SOLANACEAE

Sp. 1 (*Solanum sp.*)



SOLANACEAE

Solanum grandiflorum



SOLANACEAE

Witheringia sp.



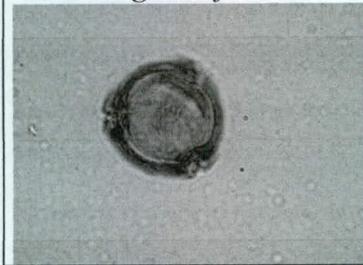
SOLANACEAE

Witheringia sp.



SOLANACEAE

Solanum grandiflorum



SOLANACEAE

Solanum arboreum



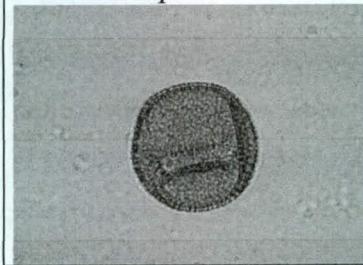
SOLANACEAE

Solanaceae sp.



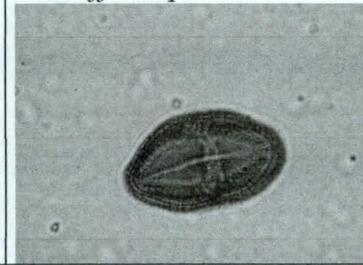
STERCULIACEAE

Waltheria sp.



TILIACEAE

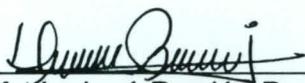
Triumffeta sp.



TILIACEAE

Heliocarpus sp.





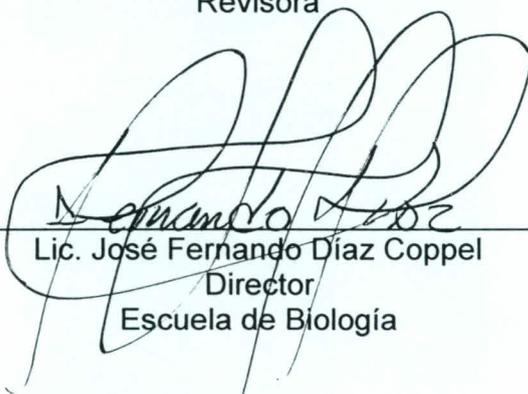
María José Dardón Peralta
Tesisista



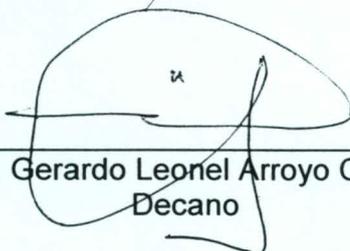
Licda. Carmen Lucía Yurrita Obiols
Asesora



Licda. Eunice Enríquez Cottón
Revisora



Lic. José Fernando Díaz Coppel
Director
Escuela de Biología



M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
Decano

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central