

Universidad de Concepción  
Campus Los Ángeles  
Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIBACTERIANA Y  
PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS EN MIELES  
MONOFLORALES CHILENAS**

Diego Carrasco Rubio

Memoria de título para optar al título de Ingeniero en  
Biotecnología Vegetal

Los Ángeles - Chile  
2023

**Análisis de capacidad antibacteriana y propiedades fisicoquímicas en mieles chilenas.**

Alumno

---

Diego Patricio Andrés Carrasco Rubio  
Ingeniero en Biotecnología Vegetal

Profesor Guía

---

Dr. Mauricio Javier Rondanelli Reyes  
Profesor Asociado  
Biólogo

Jefe de Carrera

---

Pedro Lindor Quiroz Hernández  
Profesor Asociado  
Ingeniero en Ejecución Forestal

Director de Departamento

---

Marely Cuba Díaz  
Profesor Asociado  
Doctor en Bioquímica

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecimientos al proyecto FONDEF ID19I10233 por financiar el desarrollo de esta memoria de título.

A la Universidad San Sebastián, en especial al núcleo de laboratorios, por abrirme sus puertas para la realización de esta investigación. A los profesores Braulio Contreras y Luis Vergara, por las enseñanzas entregadas, la paciencia y la buena recepción, y a Ximena del laboratorio de microbiología, por su compañía, ayuda y apoyo durante mi paso por ese laboratorio.

A la Universidad de Concepción, sus académicos y funcionarios, por aportar con conocimiento, valores y convicción a mi formación profesional y personal. En especial al profesor Mauricio Rondanelli, por su apoyo, paciencia y compañía durante este proceso tan complejo.

A mis compañeras y amigas de la carrera; Colomba, Katherine, Polette y Paula, por su amistad y compañía durante esta etapa, por hacerla más amena y por sobre todo más divertida.

A mis colegas de trabajo Guillermo y Nino, por su apoyo en este proceso, la predisposición a ayudarme, la compañía y la paciencia durante los últimos días de este proceso.

Y por sobre todo agradecer a mi familia, por acompañarme en esta etapa, brindarme su apoyo, paciencia, compañía y buenos deseos, en especial a mi Padre, quien me observa desde las estrellas.

## RESUMEN

A lo largo de los últimos años, la industria apícola en Chile se ha visto enriquecida por el descubrimiento de nuevas fuentes florales para la producción de miel monofloral y multifloral, especialmente en la región del Biobío y sectores aledaños. Estos nuevos hallazgos destacan principalmente por sus propiedades organolépticas, las cuales representan un interés primordial para los consumidores en todo el mundo. Sin embargo, no son las únicas características que permiten diferenciar la calidad de la miel, ya que esta posee otras propiedades, principalmente determinadas por las fuentes florales utilizadas en su elaboración, así como por la geografía y la temporada en la que fue producida.

Dentro de las propiedades descritas para la miel, destaca su capacidad antibacteriana. Existen mieles reconocidas a nivel nacional por esta propiedad, como la miel de Ulmo y Quillay, y a nivel internacional, como es el caso de la miel de Manuka. Además de esto, es importante conocer los parámetros fisicoquímicos de estas nuevas mieles, ya que funcionan como indicadores clave de su calidad.

En este caso, se determinó la capacidad antibacteriana de 4 mieles: 3 de ellas monoflorales (Guindo Santo, Yaqui y Tineo) y una miel multifloral. Estos resultados se compararon con los de las mieles de Ulmo y Quillay. El análisis de halos de inhibición y concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas en estas mieles permitió identificar que las 4 poseen actividad antibacteriana estadísticamente similar a al menos una de las dos mieles utilizadas para la comparación, tanto ante bacterias *Gram positivas* como *Gram negativas*. De estas, la miel multifloral presentó resultados estadísticamente superiores a los demostrados por las mieles de Ulmo y Quillay ante las bacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. Además de eso, se analizó su potencial actividad antioxidante a través de la determinación de sus compuestos fenólicos totales, ensayo en el cual todas las mieles resultaron similares, lo que sugiere una potencial actividad antioxidante en las mieles en estudio.

Finalmente, se analizaron los parámetros fisicoquímicos de todas las mieles, evidenciando que, si bien se observan buenas prácticas apícolas, aún queda trabajo por hacer para mejorar la calidad de la miel comercializada en Chile y hacia el exterior.

## ABSTRACT

Over the past years, the beekeeping industry in Chile has been enriched by the discovery of new floral sources for the production of monofloral and multifloral honey, especially in the Biobío region and surrounding areas. These new findings stand out primarily for their organoleptic properties, which are of great interest to consumers worldwide. However, these are not the only characteristics that differentiate honey's quality, as it possesses other properties mainly influenced by the floral sources used in its production, as well as the geography and season in which it was produced.

One of the highlighted properties of honey is its antibacterial capacity. There are nationally recognized honeys for this property, such as Ulmo and Quillay honey, and internationally, as in the case of Manuka honey. Additionally, it is essential to know the physicochemical parameters of these new honeys, as they serve as key indicators of their quality.

In this case, the antibacterial capacity of four honeys was determined: three monofloral (Guindo Santo, Yaqui, and Tineo) and one multifloral honey. These results were compared to those of Ulmo and Quillay honeys. The analysis of inhibition halos and minimum inhibitory and bactericidal concentrations in these honeys allowed us to identify that all four honeys have statistically similar activity to at least one of the two honeys used for comparison, against both *gram-positive* and *gram-negative* bacteria. Among these, the multifloral honey showed statistically superior results compared to Ulmo and Quillay honeys against the bacteria *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. Furthermore, their potential antioxidant activity was analyzed by determining their total phenolic compounds, in which all the honeys showed similar results, indicating potential antioxidant activity in the honeys under study.

Finally, the physicochemical parameters of all the honeys were analyzed, revealing that while good apicultural practices are evident, there is still work to be done to improve the quality of honey marketed in Chile and abroad.

## TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	10
1.1	La miel .....	11
1.2	En relación con las especies estudiadas .....	12
1.3	Mieles utilizadas para comparación .....	13
1.4	Actividad Antibacteriana .....	14
1.5	Relevancia del Estudio de la Miel .....	16
1.6	Planteamiento del Problema (Complementar elección de especies) .....	16
2	HIPÓTESIS.....	18
3	OBJETIVOS.....	19
3.1	Objetivo General.....	19
3.2	Objetivos Específicos .....	19
4	METODOLOGÍA .....	20
4.1	Análisis de Parámetros Físicoquímicos.....	20
4.2	Determinación de Polifenoles Totales.....	20
4.3	Efecto de la Adición de Polivinilpolipirrolidona.....	21
4.4	Cuantificación de Peróxido de Hidrógeno.....	22
4.5	Determinación de actividad antibacteriana .....	23
4.6	Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida .....	23
5	RESULTADOS .....	24
5.1	Análisis de Parámetros Físicoquímicos.....	24
5.2	Determinación de los Compuestos Fenólicos Totales.....	24
5.3	Cuantificación del Peróxido de Hidrógeno .....	27
5.4	Determinación de actividad antibacteriana .....	28
5.5	Concentración Mínima Inhibitoria y Bactericida .....	31

6	DISCUSIÓN.....	32
6.1	Actividad Antibacteriana.....	32
7	CONCLUSIONES.....	37
8	REFERENCIAS.....	39

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> <i>Parámetros fisicoquímicos en relación con los rangos establecidos por el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA) y el Instituto Nacional de Normalización (INN)</i> .....	24
<b>Tabla 2</b> <i>Resultados expresados en mg GAE 100 g<sup>-1</sup> miel</i> .....	26
<b>Tabla 3</b> <i>Efecto de la adición de PVPP para las muestras de miel y extractos</i> .....	26
<b>Tabla 4</b> <i>Acumulación de peróxido de hidrógeno (<math>\mu\text{M}</math>) con mediciones a las 0, 1, 2 4, 6 y 24 horas</i> .....	28
<b>Tabla 5</b> <i>Promedios de inhibición (mm) de las diferentes mieles ante las bacterias analizadas</i> .....	28
<b>Tabla 6</b> <i>Porcentajes de inhibición y bactericida de las diferentes mieles ante las bacterias analizadas</i> .....	31



**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b> <i>Curva estándar de ácido gálico para la determinación de TPC</i> .....	25
<b>Figura 2</b> Curva estándar de peróxido de hidrógeno para cuantificación. ....	27
<b>Figura 3</b> Promedios de inhibición de las mieles ante las diferentes bacterias en estudio, Las letras iguales indican que no existe diferencia significativa según Test de Tukey, $p < 0.05$ .....	30

## 1 INTRODUCCIÓN

La miel se ha utilizado como alimento y producto médico desde los comienzos de la humanidad. Es una sustancia natural producida por abejas melíferas (*Apis mellifera*) (Álvarez-Suárez et al., 2010) a partir del néctar o exudados de árboles y plantas. Siendo el único edulcorante natural disponible, la miel ha sido un alimento importante para el *Homo sapiens* desde sus inicios.

Su composición es bastante variable y depende principalmente de la fuente floral; sin embargo, ciertos factores externos también juegan un papel importante, como la temporada, el medio ambiente y el procesamiento de esta (Gheldof y Engeseth, 2002). Todos estos factores en conjunto dan origen a una amplia gama de componentes presentes en la miel, muchos de los cuales se sabe que cuentan con propiedades antibacterianas, incluyendo ácidos fenólicos y flavonoides, ciertas enzimas (glucosa oxidasa, catalasa) y aminoácidos (Beretta et al., 2005).

Es por lo anterior por lo que todas las mieles poseen propiedades organolépticas y nutricionales diferentes, haciendo que los estudios en torno a ellas se vuelvan de gran importancia debido a sus posibles aplicaciones en la industria alimenticia, farmacéutica o biotecnológica.

En Chile, durante los últimos años, se ha visto una disminución en la producción melífera, principalmente, relacionada con el cambio climático que ha originado un decrecimiento en las precipitaciones, altas temperaturas y mortalidad en las colmenas (Gajardo-Rojas et al., 2022). Esta disminución de la producción hace que la disponibilidad de la miel nacional y para exportación se vea reducida, por ende, es de vital importancia otorgar valor agregado a la miel de producción nacional más allá de sus propiedades organolépticas, con el fin de mantener el interés del mercado en la producción nacional y potenciar la limitada producción actual.

Actualmente, existen diferentes propiedades atribuibles a la miel, algunas descubiertas recientemente, como la capacidad antibacteriana y antioxidante de la miel de Manuka que, más allá de sus componentes principales, posee una gran variedad de compuestos menores capaces de otorgarle un gran número de efectos nutricionales y biológicos (Álvarez-Suárez et al., 2014) y otras que datan de antiguas costumbres respecto con el uso de esta para el tratamiento de heridas y quemaduras. El análisis de las propiedades antibacterianas de la miel surge como alternativa en la búsqueda de nuevos antibióticos, de este modo, la miel madura consiste en un 80 % en azúcares, principalmente, glucosa y fructosa, asimismo, tiene menos de un 20 % de humedad en su composición. Esta alta concentración de azúcares y su bajo contenido de humedad produce estrés osmótico, lo que previene la contaminación de la miel por microorganismos (Kwakman y Zaat, 2012).

Pese a las propiedades que le confieren a la miel un cierto nivel de inocuidad, existen normativas actuales para su regulación, las que están basadas en indicaciones entregadas por parte del Instituto Nacional de Normalización (INN) y el Codex alimentarius, con las que toda miel debe cumplir para su comercialización formal y exportación.

En general, la miel adopta las propiedades de las plantas desde las que las abejas obtuvieron el néctar y/o exudados para su elaboración, así como del área geográfica en la que se encuentra la colmena (Córdova-Córdova et al., 2013). Por ello, el análisis de mieles con fuentes florales endémicas se vuelve importante, debido a que podrían ser la fuente de nuevos productos en el mercado alimenticio y farmacéutico.

En consecuencia, el objetivo del presente trabajo consistió en determinar la actividad antibacteriana que presentan las mieles de *Colletia hystrix* Clos, *Weinmannia trichosperma* Cav., *Eucryphia glutinosa* (Poepp. & Endl.) Baill y una miel multifloral, en comparación con las mieles de *Eucryphia cordifolia* Cav. y *Quillaja saponaria* Molina.

## 1.1 La miel

La miel es el único endulzante que puede ser almacenado y utilizado tal y como se produce en la naturaleza, esto sin necesidad de refinamiento, así, en un comienzo fue

utilizada como ingrediente ceremonial y medicinal, hasta que los griegos y los romanos comenzaron a utilizarla como alimento (White, 1978). La miel es producida a partir del néctar de las flores o exudados de plantas, de esta manera, las abejas digieren estas sustancias azucaradas, las enriquecen con sus propias sustancias y las regurgitan en las celdas de la colmena (Libonatti et al., 2014).

En promedio, pese a que la miel posee alrededor de un 20% de humedad y 80 % de azúcares, el resto se reparte entre minerales, aminoácidos, proteínas y ácidos orgánicos, por esta razón, se recomienda que el consumo diario sea en pequeñas cantidades (Bogdanov et al., 2008).

## 1.2 En relación con las especies estudiadas

Guindo Santo, *Eucryphia glutinosa* (Poepp. & Endl.) Baill, es un árbol pequeño o arbusto, que puede alcanzar hasta 5 m de altura. Es una especie endémica de Chile (Hechenleitner et al., 2005). Se encuentra desde la provincia de Linares (36°05' S 71°10' W) hasta la provincia de Malleco (38°14' S 71°45' W), entre los 200 y 1400 m de altitud, especialmente en la precordillera andina (Rodríguez, 2004; Hechenleitner et al., 2005). La especie se concentra en gran medida en la Región del Biobío. Actualmente, *Eucryphia glutinosa* es mayormente utilizada con fines ornamentales debido a sus grandes flores blancas y el cambio en la tonalidad de sus hojas en otoño (Benoit, 1989). No obstante, en los últimos años se ha descubierto su relevancia para la industria apícola, puesto que su miel ha despertado interés por sus propiedades organolépticas y nutricionales.

Tineo, *Weinmannia trichosperma* Cav., es un árbol siempreverde de follaje claro y copa rala. En etapa adulta, alcanza una altura de hasta 40 m y su tronco un diámetro de 2 m. Esta especie crece desde la costa de la provincia de Talca hasta la provincia de Última Esperanza, en sectores de bosque húmedo, quebradas o lugares pantanosos desde el nivel del mar hasta 950 metros de altitud. Su estado de conservación es considerado en peligro para la región del Maule, debido a la tala por su preciada madera, de alto valor ornamental. A esta especie vegetal se le atribuyen propiedades medicinales al emplearla como cicatrizante de heridas (García y Ormazabal, 2008)

Yaqui, *Colletia hystrix* Clos., es un arbusto perenne, de porte arbóreo, que puede alcanzar unos 3 m de altura, aunque comúnmente ronda los 2 m. (Poussart, 1902). El fruto es una cápsula tricoca que mide unos 5 mm de diámetro. Entre los usos de esta especie destaca el de su corteza, por tener presencia de saponinas (Bischeimer, 2012), y también su miel, la cual se describió recientemente en la comuna de Alto Biobío (Fernandez, 2019)

Dentro de las mieles en estudio, se incluye además una miel multifloral en la que podemos destacar, por ejemplo, un 12% de Poleo dentro de su composición (Anexo 1), *Mentha pulegium* L. Se trata de una hierba siempreverde de 20-50 cm de altura. (MINSAL, 2011). Se emplea tradicionalmente en el tratamiento de trastornos del aparato digestivo debido a sus propiedades carminativas y antiespasmódicas. Se han estudiado sus propiedades antimicrobianas, las cuales se deben a su aceite esencial, el cual posee pulegona, una sustancia con actividad antibacteriana empleada en productos de higiene bucodental, desinfectantes ambientales o como preservante de alimentos (MINSAL, 2011).

### **1.3 Mieles utilizadas para comparación**

Ulmo, *Eucryphia cordifolia* Cav., es un árbol siempreverde corpulento de copa redondeada y tronco recto, que alcanza una altura de hasta 40 m y un diámetro de hasta 2 m. Crece desde la VIII a la X región, bajo los 700 m s. n. m., principalmente en la Cordillera de la Costa. También se encuentra en Argentina. Habita lugares húmedos y ricos en materia orgánica. No forma bosques puros, siendo frecuente en los tipos forestales Roble-Raulí-Coihue y Siempreverde (Marticorena y Quezada, 1985). Esta especie presenta un alto valor melífero, debido a la abundante cantidad de néctar que produce en sus flores. Actualmente existe información publicada en relación con su capacidad antioxidante, la cual destaca por sobre la gran mayoría de mieles disponibles en el mercado (Schencke et al., 2015).

Quillay, *Quillaja saponaria* Mol., es un árbol o arbusto de 2 -10 m de altura. (Ministerio de Salud [MINSAL], 2011). Puede encontrarse en las regiones de Coquimbo,

Valparaíso, Metropolitana de Santiago, O'Higgins, Maule, Biobío y Araucanía (Rodríguez et al., 1983).

El pueblo Mapuche ha utilizado la corteza y las hojas de quillay (desde hace mucho tiempo, tradicionalmente) como un jabón natural que contribuye a la higiene personal, como insumo medicinal y para el cuidado de las prendas de lana; más tarde, su uso se extendió, dentro y fuera de nuestro país, haciendo de esta especie chilena una de las materias primas más reconocidas y utilizadas en la elaboración de jabones y cosméticos. En la actualidad, el quillay mayoritariamente es utilizado para generar productos químicos, con múltiples aplicaciones. (Fundación para la Innovación Agraria [FIA], 2017). En relación con su miel, esta ha sido ampliamente estudiada por Montenegro et al. (2009), y al igual que su extracto, la especie ha presentado un porcentaje de capacidad antibacteriana y antioxidante de interés para la industria melífera.

#### **1.4 Actividad Antibacteriana**

La resistencia a los antibióticos es actualmente uno de los problemas más grandes que posee la sociedad, sobre todo por el uso indiscriminado e indebido de estos. Actualmente existen ciertas bacterias categorizadas como *Multidrug-resistant* o MDR (Martin y Bachman, 2018) que se han convertido en un gran problema a nivel mundial debido a su alta resistencia adquirida a través del tiempo contra antibióticos de uso común. Por esta razón, surge la necesidad de buscar alternativas de tratamiento, y una de esas alternativas es la miel.

La miel es uno de los remedios más antiguos y tradicionales que existen, con una amplia reputación en el tratamiento de infecciones desde hace más de 2000 años (Pećanac et al., 2013). Estas capacidades antibacterianas pueden atribuirse a diversos factores, como su alta osmolaridad, acidez y la presencia de compuestos como el peróxido de hidrógeno en su composición (Molan y Cooper, 2000). Además, la miel suele adquirir propiedades presentes en las especies vegetales que utiliza como fuente floral

para la extracción de néctar (Persano y Piro, 2004), por lo que se convierte en un objeto de interés en la búsqueda de alternativas para el control de ciertos microorganismos.

Dentro de la gama de compuestos que le confieren propiedades a la miel, están los compuestos fenólicos, que, si bien están más relacionados a la actividad antioxidante, estudios han sugerido con anterioridad que también son partícipes en la capacidad antibacteriana de la miel debido a su capacidad de reducir radicales libres (Almasaudi et al., 2017). Dado que todas las mieles poseen una composición diferente de acuerdo con la fuente floral, se hace necesario el análisis de todos los factores que pudiesen estar entregándole propiedades únicas, como en el caso de la miel de Manuka, cuya actividad llevó a la creación de un único factor de medición (*Unique Manuka Factor*) debido a su capacidad antibacteriana proveniente de su contenido de metilglioxal (Johnston et al., 2018).

Además de los compuestos fenólicos, en la gran mayoría de las mieles es posible encontrar otros compuestos que le confieren ciertas propiedades, como lo es el peróxido de hidrógeno. Se presume que su función es evitar el deterioro de la miel debido al desarrollo de microorganismos mientras esta aún está inmadura (Kwakman y Zaat, 2012). Sin embargo, también se ha descubierto que es partícipe dentro de las propiedades antibacterianas propias de la miel, debido a que, al inhibir la catalasa en algunos ensayos (enzima que produce peróxido de hidrógeno a partir de la digestión de glucosa) se observa una disminución de la capacidad antibacteriana de la miel (Allen et al., 1991).

Actualmente, se conoce una amplia gama de bacterias tanto grampositivas como gramnegativas. En ambos casos, hay bacterias de relevancia clínica debido a que se encuentran directamente relacionadas con algunas de las enfermedades más comunes que existen en la sociedad actual. Entre ellas se encuentran *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

## **1.5 Relevancia del Estudio de la Miel**

En Chile, específicamente en la región del Biobío, se encuentra la comuna de Santa Bárbara, conocida como la capital nacional de la miel, y la comuna de Alto Biobío, en donde parte de la economía de subsistencia de la población, principalmente pewenche, es la producción de miel. En estas comunas, así como en otros sectores del país, se producen diferentes tipos de mieles con un alto valor debido a sus propiedades organolépticas. Sin embargo, la miel también ha demostrado poseer otras cualidades adoptadas de las especies vegetales de las cuales se produce, lo que la convierte en un importante recurso alimenticio y potencialmente útil en la industria biotecnológica.

En este contexto, considerando que Chile es uno de los países líderes en exportaciones de miel y debido a la variedad nativa y endémica de su flora melífera, es relevante saber qué características poseen estas mieles que podrían otorgarles un mayor valor agregado, ya sea nutricional, económico o biotecnológico.

## **1.6 Planteamiento del Problema**

En Chile, existe un número importante de estudios relacionados con la miel y otros productos apícolas, especialmente en lo que respecta a sus capacidades antioxidantes y antibacterianas. Entre ellos, destacan los estudios de Montenegro et al. (2009); Bridi et al. (2017) y Acevedo et al. (2017), quienes han investigado dichas características en algunas de las mieles chilenas.

Recientemente, diversos estudios realizados por el Laboratorio de Palinología y Ecología Vegetal en la región del Biobío y sus alrededores han descrito nuevas mieles monoflorales y multiflorales características por estar producidas a partir de especies vegetales que destacan por su riqueza nativa y endémica, y que presentan propiedades organolépticas de interés para el consumidor; como el caso de la miel de Guindo Santo; la miel de Yaqui, la cual es poco conocida en Chile; además, está la miel de Tineo cuya especie de es conocida por poseer propiedades cicatrizantes, y una miel multifloral en la que destaca la presencia de un 12% de poleo dentro de su composición (Anexo 1), esta especie suele encontrarse en concentraciones mucho menores en los casos en que está presente en las diferentes mieles, esta es una especie que posee propiedades



carminativas, antiespasmódicas y antimicrobianas. Actualmente, no existen estudios publicados relacionados con la actividad antibacteriana y antioxidante de estas cuatro mieles, por lo que este tema será objeto de estudio en el presente trabajo de investigación.

Con el propósito de obtener resultados comparativos con otras mieles chilenas que ya se han estudiado, se utilizaron las mieles de Ulmo y Quillay, de las cuales sí se conocen propiedades relacionadas con la actividad antibacteriana y antioxidante.

## 2 HIPÓTESIS

De acuerdo con los antecedentes relacionados con la importancia medicinal y nutricional de las especies vegetales melíferas, de la riqueza nativa y endémica del recurso floral desde el cual se elaboran las mieles en estudio, y considerando los estudios existentes que demuestran la actividad antibacteriana presente en mieles monoflorales cuya composición polínica principal se basa en especies vegetales endémicas del país, se espera lo siguiente:

1. Que las mieles monoflorales de las especies nativas y endémicas, *Colletia hystrix*, *Eucryphia glutinosa* y *Weinmannia trichosperma* presentan actividad antibacteriana significativa al igual que las mieles de *Eucryphia cordifolia* y *Quillaja saponaria*, de comprobada actividad.
2. Qué al comparar la actividad antibacteriana de las mieles monoflorales en estudio con una miel multifloral, ésta sea potencialmente de mayor grado de efectividad dado el carácter polifloral de su constitución polínica, lo que incrementaría la sinergia de esta actividad.

Por otra parte, y considerando los antecedentes históricos registrados en Chile en cuanto al cumplimiento de las normas de inocuidad alimentaria respecto del producto miel, se espera lo siguiente:

3. Que todas las mieles analizadas en este estudio cumplan con los parámetros fisicoquímicos establecidos por el Instituto Nacional de Normalización (INN) y el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile (RSA), homologado éste último con el *Codex Alimentarius*, para la miel de consumo.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Determinar los parámetros fisicoquímicos y la actividad antibacteriana en mieles de *Colletia hystrix*, *Eucryphia glutinosa*, *Weinmannia trichosperma* y una miel multifloral, comparando su actividad con datos obtenidos en esta investigación y bibliografía para *Eucryphia cordifolia* y *Quillaja saponaria*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Determinar los parámetros fisicoquímicos de las mieles en estudio según lo establecido por el Reglamento Sanitario de Los Alimentos y el Codex Alimentarius.
- Determinar la capacidad antibacteriana de las mieles en estudio mediante una metodología de difusión simple en agar.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) para las mieles en estudio.
- Cuantificar la acumulación de peróxido de hidrógeno de las mieles en estudio mediante la metodología de Kwakman et al. (2011).
- Determinar la concentración de compuestos fenólicos totales presentes en cada una de las mieles objeto de estudio y sus extractos metanólicos mediante el método Folin-Ciocalteu (FC).
- Determinar el efecto de la adición de Polivinilpolipirrolidona (PVPP) en mieles y sus extractos metanólicos.

## 4 METODOLOGÍA

### 4.1 Análisis de Parámetros Fisicoquímicos

Se determinaron las propiedades fisicoquímicas de todas las mieles en análisis mediante los criterios establecidos por la norma chilena de clasificación de mieles. Los parámetros analizados corresponden al contenido de humedad, conductividad eléctrica, pH, contenido de ceniza, sólidos insolubles y el contenido de hidroximetilfurfural (HMF).

El contenido de humedad se determinó a través de refractometría según lo descrito por la norma chilena NCh3026 (Instituto Nacional de Normalización [INN], 2006a). Para la conductividad eléctrica, se preparó una solución diluida de miel en agua destilada, que posteriormente se analizó en un medidor de conductividad eléctrica siguiendo lo descrito en la norma chilena NCh3064 (INN, 2007a). El pH de las muestras de miel se determinó según la norma chilena NCh3019 a través de la determinación de acidez libre (INN, 2006b).

Se cuantificó el contenido de ceniza de cada una de las mieles mediante la incineración de 100 g de cada una de las mieles, siguiendo el protocolo descrito por la norma chilena NCh3102 (INN, 2007b). El contenido de sólidos insolubles en agua se obtuvo a través de un análisis de gravimetría, utilizando la metodología descrita en la norma chilena NCh3047 (INN, 2007c). Finalmente, el contenido de hidroximetilfurfural se calculó mediante espectrofotometría UV en un espectrofotómetro UV-Vis a una absorbancia de 284 y 336 nm de acuerdo con la metodología descrita en la norma chilena NCh3046 (INN, 2006c).

### 4.2 Determinación de Polifenoles Totales

Se determinó la concentración de compuestos fenólicos totales (CFT) presentes en cada una de las mieles según la metodología descrita por Montenegro et al. (2009) y Montenegro y Ortega (2011) con algunas modificaciones. Para cada una de las mieles, se preparó una dilución (0,2 g en 4 mL de agua destilada) y un extracto concentrado mediante la dilución de 5 g de miel a un volumen final de 25 mL en agua a pH 2 (HCl). Para estas diluciones, se dispusieron muestras de miel calentador de bloque seco a una

temperatura máxima de 37°C durante un tiempo máximo de 12 minutos para favorecer su posterior dilución, realizada con la ayuda de un agitador magnético.

La solución diluida de miel se transfirió a una columna (25 cm de altura x 2 cm de diámetro) formada por resina tipo Amberlita XAD-2 y se eluye con 15 mL de agua destilada acidificada (HCl, pH 2), seguido de 15 mL de agua destilada y finalmente 50 mL de Metanol al 98 %. Se recuperó la fracción metanólica de la elución para posteriormente ser evaporada en un rotavapor BUCHI R-300 con rotación a 100 rpm, vacío de 200 mbar y una temperatura de 45 °C por 90 minutos.

El residuo obtenido se almacenó a -4 °C en la oscuridad hasta su análisis. El contenido total de compuestos fenólicos se determinó con el método de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). Un volumen de 500 µL de la dilución de miel o el extracto se mezcló con 2 mL del reactivo FC previamente preparado en una proporción de 1:10 (v/v) y 1,2 mL de una solución acuosa de carbonato de sodio al 20 %. Tras un periodo de incubación de 60 minutos en oscuridad, se realizó la medición de absorbancia a 760 nm usando un lector de microplacas EPOCH. Finalmente, se determinó la concentración de polifenoles totales en la miel y el extracto, en equivalentes de ácido gálico mediante la elaboración de una curva de calibración con las concentraciones 0, 5, 15, 25, 50, 75 y 100 µM de ácido gálico a partir de la dilución de una solución madre a una concentración de  $2,3552 \times 10^{-3} \text{M}$ . Los resultados se expresaron como miligramos de ácido gálico equivalentes por 100 g de miel (mg GAE 100 g<sup>-1</sup> miel) y se reportaron como el promedio  $\pm$  la desviación estándar de las mediciones en triplicado.

### **4.3 Efecto de la Adición de Polivinilpirrolidona**

En línea con lo anterior, se determinó el efecto del polivinilpirrolidona (PVPP) en el contenido total de compuestos fenólicos de la muestra (extracto y miel diluida) a partir de la metodología de Bridi et al. (2017). Se añadieron 100 mg de PVPP a 1 mL de cada una de las muestras. La mezcla se agitó vigorosamente en un vortex durante 30 segundos, para posteriormente centrifugarla a 5000 × g por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se tomó 500 µL del sobrenadante y nuevamente se centrifugó bajo las

mismas condiciones. Finalmente, se determinó el efecto mediante método de FC previamente descrito y la posterior aplicación de la siguiente fórmula:

$$FC_{xh} = FC_{tot} - FC_{pvpp}$$

Donde:

$FC_{xh}$  = valor de FC para polifenoles.

$FC_{tot}$  = valor de FC sin tratamiento con PVPP.

$FC_{pvpp}$  = valor de FC con tratamiento de PVPP.

#### 4.4 Cuantificación de Peróxido de Hidrógeno

El contenido de peróxido de hidrógeno en cada una de las mieles se determinó mediante la metodología descrita por Kwakman et al. (2011). Se preparó una solución al 30 % m/v de miel en agua destilada para cada una de las mieles en estudio, para estas diluciones, se dispusieron muestras de miel calentador de bloque seco a una temperatura máxima de 37°C durante un tiempo máximo de 12 minutos para favorecer su posterior dilución, realizada con la ayuda de un agitador magnético. Posteriormente, 40 µL de las soluciones de miel se añadieron a 135 µL de reactivo compuesto por 50 µg/mL de o-dianisidina y 20 µg/mL de peroxidasa de rábano tipo VI en buffer fosfato a pH 6,5. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante la adición de 120 µL de solución de ácido sulfúrico 6M. La absorbancia de la solución se determinó inmediatamente tras la reacción a 540 nm en un lector de microplacas. Se realizó un total de cinco mediciones en triplicado para cada miel, al momento 0 y tras 1, 2, 6 y 24 horas de preparada la solución acuosa. La concentración de peróxido de hidrógeno presente en las muestras se determinó mediante la elaboración de una curva de calibración con las concentraciones 0, 2, 1, 20, 40, 80, 160, 320 y 550 µM a partir de peróxido de hidrógeno al 30 %. Los resultados son expresados como el valor de la concentración (µM) de peróxido de hidrógeno a las diferentes horas de medición.

#### **4.5 Determinación de actividad antibacteriana**

Se utilizó una metodología de difusión simple en agar para la determinación de los halos de inhibición producidos por las mieles en un estado natural sin diluir. Para este ensayo, primeramente, se prepararon placas Petri con agar Muller-Hinton, las que posteriormente fueron inoculadas con diferentes suspensiones bacterianas a una concentración de aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL (McFarland 0,5) usando tórula de algodón. A continuación, se realizaron perforaciones en forma de disco en el agar con un sacabocados, en las que posteriormente se depositó miel en estado puro cuidando no derramar hacia fuera de la perforación. El ensayo consistió se realizó en triplicado para cada una de las mieles frente a cada una de las bacterias en estudio. Para la medición de los halos, se hizo uso de un pie de metro y se consideró desde el borde de la perforación hasta el límite de la zona sin proliferación bacteriana.

#### **4.6 Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida**

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), se hizo uso de la metodología de dilución seriada en microplaca. Se preparó una solución inicial de miel a una concentración del 70% m/v la cual posteriormente se diluyó hasta llegar a una concentración mínima del 0,03%. A cada una de las concentraciones, se les añadió 10 $\mu$ l de suspensión bacteriana para obtener una concentración final de  $5 \times 10^5$  UFC/ml.

El desarrollo bacteriano se analizó tras 24 horas de incubación a 35°C midiendo absorbancia en un lector de microplacas a una longitud de onda de 520nm.

Para la concentración mínima bactericida (CMB), se prepararon placas Petri con agar Sangre y MacConkey en las que posterior a la revisión de absorbancia, se sembró una gota de cada uno de los pocillos de las microplacas ya analizadas con el fin de determinar la CMB.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análisis de Parámetros Fisicoquímicos

Los resultados obtenidos del análisis fisicoquímico de cada una de las mieles en estudio presentan valores, en su mayoría, dentro de los límites dispuestos por el Codex Alimentarius y el Instituto Nacional de Normalización (INN). En este contexto, la miel de Tineo es la única cuyo porcentaje de humedad se encuentra sobre el 18 % dispuesto por la normativa RSA, pero dentro del rango dispuesto por el INN (ver Tabla 1).

**Tabla 1**

*Parámetros fisicoquímicos en relación con los rangos establecidos por el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA) y el Instituto Nacional de Normalización (INN)*

Miel	Humedad (%)	Sólidos insolubles (%)	HMF (mg/kg miel)	Cenizas (%)	Cond. Eléctrica (mS/cm)	pH
Quillay	16,7	0,03	2,994	0,08	0,29	4,35
Guindo Santo	16,0	0,02	0,598	0,24	0,43	4,73
Yaqui	16,9	0,01	1,961	0,05	0,40	4,35
Tineo	18,8	0,01	1,886	0,11	0,43	3,83
Ulmo	16,0	0,02	1,856	0,07	0,54	4,15
Multifloral	17,0	0,01	0,344	0,20	0,72	3,73
Codex Alimentarius	<18	<1	<40	<0,8		
Norma INN	≤20	≤0,1	≤40	≤0,8	≤0,8	

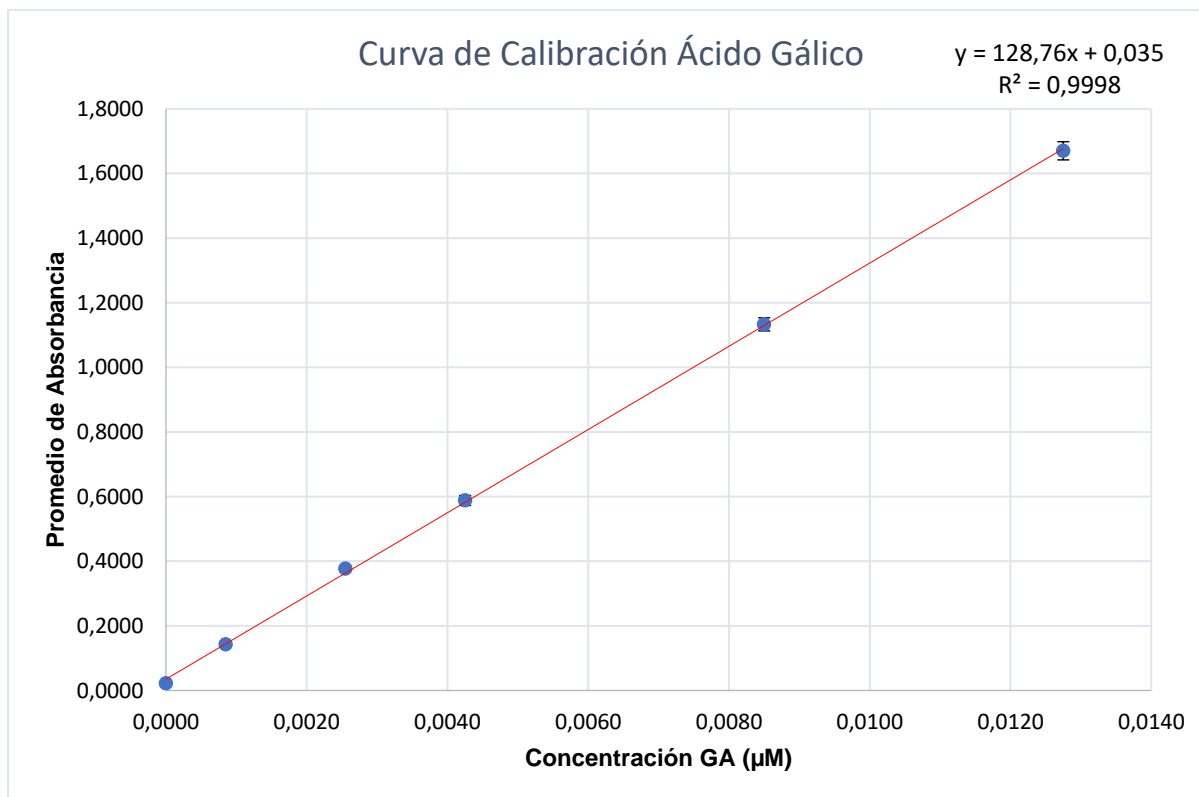
### 5.2 Determinación de los Compuestos Fenólicos Totales

Se midió la absorbancia de todas las muestras de miel y sus extractos. Con las absorbancias obtenidas, basándose en la ecuación obtenida en la curva de calibración (ver Figura 1), se obtuvo como resultado la equivalencia de ácido gálico por cada 100 g de miel (ver Tabla 2).



### Figura 1

Curva estándar de ácido gálico para la determinación de compuestos fenólicos totales (CFT)



El cálculo del contenido total de compuestos fenólicos para todas las muestras se realizó haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$CFT = C \times \frac{V}{m}$$

Donde:

CFT = contenido total de compuestos fenólicos.

C = los equivalentes en mg/mL obtenidos a través de la ecuación de la recta.

V = el volumen de la solución en mL. (0,5)

m = la masa de la muestra en gramos.

**Tabla 2**

Resultados expresados en mg GAE 100 g<sup>-1</sup> miel (equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos de miel)

	Miel		Extractos
	CFT (mg GAE 100 g <sup>-1</sup> miel)		CFT (mg GAE 100 g <sup>-1</sup> miel)
Quillay	77,1±2,2	Quillay	4,9±0,2
Guindo Santo	68,8±5,4	Guindo Santo	5,1±0,2
Yaqui	75,1±0,9	Yaqui	5,4±0,6
Multifloral	101,8±9,2	Multifloral	6,6±0,3
Ulmo	77,2±17,0	Ulmo	4,9±0,2
Tineo	85,6±3,4	Tineo	6,2±0,3

Nota. Los valores representan el promedio ± la desviación estándar de cada una de las muestras.

El efecto del PVPP en cada una de las muestras se determinó de acuerdo con la fórmula previamente descrita en la metodología. Se observó una disminución del contenido total de compuestos fenólicos detectado tras la aplicación del tratamiento para todas las muestras, presentando un valor negativo tras el tratamiento para las mieles de Yaqui y Multifloral (ver Tabla 3).

**Tabla 3**

Efecto de la adición de PVPP para las muestras de miel y extractos

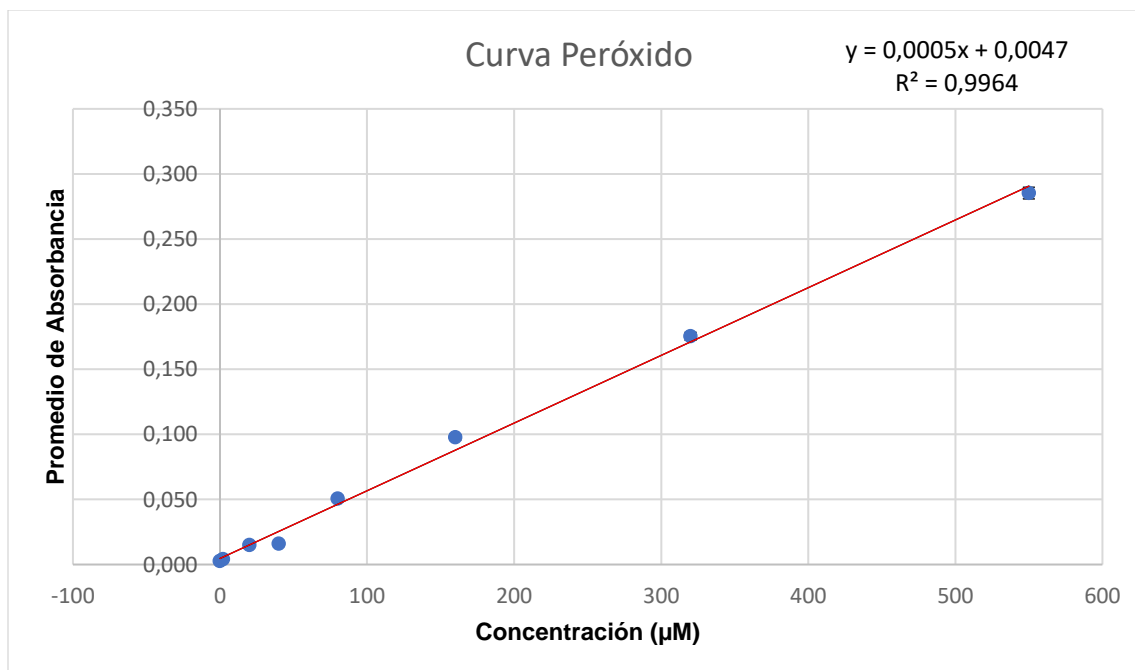
	Miel		Extractos	
	FC <sub>PVPP</sub> (mg GAE 100 g <sup>-1</sup> miel)	FC <sub>XH</sub>	FC <sub>PVPP</sub> (mg GAE 100 g <sup>-1</sup> miel)	FC <sub>XH</sub>
Quillay	57,6±4,3	19,4±2,0	0,9±0,0	4,0±0,1
Guindo Santo	65,3±5,4	3,4±0,0	0,7±0,6	4,4±0,4
Yaqui	84,0±1,5	-8,9±0,5	1,4±0,0	4,0±0,5
Multifloral	102,3±2,5	-0,5±6,7	1,7±0,0	4,9±0,2
Ulmo	45,8±3,8	31,2±13,2	0,7±0,0	4,1±0,1
Tineo	58,5±1,3	27,1±2,0	0,9±0,0	5,2±0,2

### 5.3 Cuantificación del Peróxido de Hidrógeno

Con las absorbancias obtenidas, basándose en la curva de calibración (ver Figura 2) se obtuvo la cuantificación de la acumulación de peróxido de hidrógeno en el tiempo.

#### Figura 2

Curva estándar de peróxido de hidrógeno para cuantificación de la acumulación.



Todas las mieles presentaron lecturas en las horas analizadas. La miel de Yaqui presentó la concentración más alta a las 24 horas, mientras que la concentración más baja la presentó la miel de Ulmo en la medición a tiempo 0 (ver Tabla 4).

**Tabla 4**

Acumulación de peróxido de hidrógeno ( $\mu\text{M}$ ) con mediciones a las 0, 1, 2, 4, 6 y 24 horas

Miel	Acumulación de Peróxido de Hidrogeno ( $\mu\text{M}$ )					
	0 horas	1 hora	2 horas	4 horas	6 horas	24 horas
<b>Ulmo</b>	18,60	57,93	59,93	42,60	29,27	33,93
<b>Yaqui</b>	35,27	49,93	58,60	50,60	74,60	81,97
<b>Tineo</b>	20,60	52,60	55,27	45,93	57,93	31,27
<b>Multifloral</b>	25,93	31,93	51,27	51,27	59,93	46,60
<b>Guindo Santo</b>	44,60	47,27	79,27	48,60	60,60	57,93
<b>Quillay</b>	46,60	51,27	44,60	48,60	51,27	49,27

#### 5.4 Determinación de actividad antibacteriana

Se observó actividad antibacteriana en todas las mieles, a excepción de la miel de Yaqui que no presentó inhibición ante *Enterococcus faecalis*, frente a esta bacteria se presentaron los menores halos de inhibición para todas las mieles en estudio. La mejor actividad se observa ante *Escherichia coli* con halos de inhibición entre 8,0 y 14,7mm para la miel de Tineo y multifloral respectivamente. (Tabla 5).

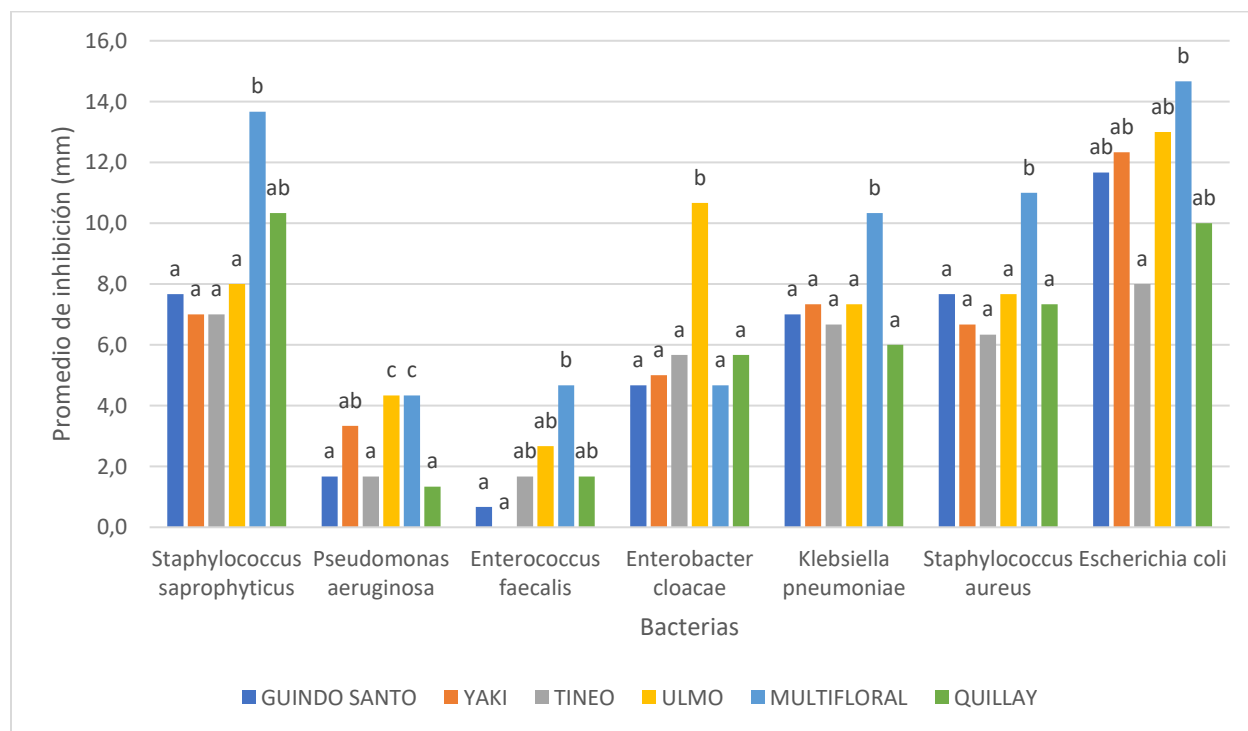
**Tabla 5**

*Promedios de inhibición (mm) de las diferentes mieles ante las bacterias analizadas*

<b>Organismo</b>	<b>Miel de Guindo Santo</b>	<b>Miel de Yaqui</b>	<b>Miel de Tineo</b>	<b>Miel de Ulmo</b>	<b>Miel Multifloral</b>	<b>Miel de Quillay</b>
<b><i>Staphylococcus saprophyticus</i></b>	7,7±0,6	7,0±2,6	7,0±0,0	8,0±0,0	13,7±1,5	10,3±0,6
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	1,7±0,6	3,3±0,6	1,7±0,6	4,3±1,2	4,3±1,5	1,3±0,6
<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>	0,7±0,6	0,0±0,0	1,7±0,6	2,7±1,5	4,7±0,6	1,7±1,2
<b><i>Enterobacter cloacae</i></b>	4,7±1,5	5,0±0,0	5,7±1,2	10,7±1,2	4,7±2,1	5,7±1,2
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	7,0±0,0	7,3±0,6	6,7±0,6	7,3±0,6	10,3±0,6	6,0±0,0
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	7,7±0,6	6,7±0,6	6,3±0,6	7,7±0,6	11,0±1,0	7,3±0,6
<b><i>Escherichia coli</i></b>	11,73,2	12,3±1,5	8,0±2,0	13,0±2,0	14,7±2,5	10,0±1,0

### Figura 3

Promedios de inhibición de las mieles ante las diferentes bacterias en estudio, Las letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre las mieles ante cada bacteria según Test de Tukey,  $p < 0.05$



Se observa una diferencia estadísticamente significativa para la miel multiflora ante *Staphylococcus saprophyticus*, la miel de Quillay presentó su promedio de inhibición más alto ante esta bacteria, pero sin presentar diferencias estadísticamente significativas con el resto de las mieles.

*Pseudomonas aeruginosa* fue una de las dos bacterias, junto con *Enterococcus faecalis* que presentaron los halos de inhibición más bajos, en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* destacan las mieles de Ulmo y multiflora con los promedios de inhibición más altos.

Para *Enterococcus faecalis* la miel multiflora fue la que obtuvo el promedio de inhibición más alto, sin embargo, solo presentó diferencias estadísticamente

significativas ante las mieles de Guindo Santo y Yaqui; el resto de las mieles no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

En lo relativo a *Enterobacter cloacae*, la miel de Ulmo fue la que presentó el promedio de inhibición más alto y estadísticamente significativo ante el resto de las mieles en estudio, las que no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí.

En el caso de *Klebsiella pneumoniae*, la miel multifloral fue la que presentó el promedio de inhibición más alto, siendo estadísticamente significativo en comparación con el resto de las mieles, las que son estadísticamente idénticas entre sí; cabe señalar que el mismo caso se repite ante *Staphylococcus aureus*.

Por otro lado, los promedios de inhibición para *Escherichia coli* fueron los más altos para la mayoría de las mieles, entre las que el promedio de inhibición más alto corresponde con la miel multifloral, sin embargo, solo presentó una diferencia estadísticamente significativa ante la miel de Tineo, pues el resto de las mieles son estadísticamente idénticas (Figura 3).

## 5.5 Concentración Mínima Inhibitoria y Bactericida

**Tabla 6**

*Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de las diferentes mieles ante Staphylococcus aureus y Escherichia coli, expresado en porcentajes.*

Cepas	Guindo Santo		Yaqui		Tineo		Ulmo		Multifloral		Quillay	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	4,38	8,75	8,75	8,75	4,38	8,75	2,19	4,38	4,38	8,75	2,19	4,38
<b><i>Escherichia coli</i></b>	17,5	17,5	35	35	35	70	35	NA	4,38	8,75	8,75	8,75

Se determinó las concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas para todas las mieles. Ante *Staphylococcus aureus*, las mieles de Ulmo y Quillay presentaron las

concentraciones inhibitorias y bactericidas más bajas, seguidos por las mieles de Guindo Santo, Tineo y Multifloral que fueron idénticas entre sí. Por su parte, la miel de Yaqui demostró un efecto bactericida a la misma concentración que las mieles mencionadas, pero concentración mínima inhibitoria fue la más alta de todas.

Respecto de *Escherichia coli*, los mejores resultados fueron obtenidos por la miel multifloral, con una concentración mínima inhibitoria más baja que el resto de las mieles, seguida de la miel de Quillay, con la que comparte la misma concentración mínima bactericida, con la diferencia que, en esta última, la CMI y CMB son idénticas. Del resto de las mieles, la miel de Guindo Santo presentó promedios de inhibición y bactericida idénticos, al igual que la miel de Yaqui. La miel de Tineo presentó una concentración mínima inhibitoria al 35% de concentración, mientras que su concentración mínima bactericida fue la concentración más alta utilizada en el ensayo. Asimismo, la miel de Ulmo comparte la concentración mínima inhibitoria con las mieles de Yaqui y Tineo, pese a ello, no demostró efecto bactericida en ninguna de las concentraciones analizadas.

## 6 DISCUSIÓN

### 6.1 Actividad Antibacteriana

El análisis de la actividad antibacteriana realizado a las mieles en estudio evidencia la actividad presente en mieles que, hasta la fecha, no estaban descritas, especialmente, la miel multifloral en este estudio, la que demostró una actividad antibacteriana en promedio igual o superior a las mieles usadas como comparación ante las diferentes bacterias. Por otro lado, las mieles de Ulmo y Quillay, debido a sus propiedades y recientes estudios en torno a ellas [Montenegro et al., (2009); Bridi et al., (2017); Acevedo et al., (2017)], fueron seleccionadas como un sujeto de comparación para el resto de las mieles.

En cuanto a la actividad antibacteriana determinada a través de los halos de inhibición, la miel multifloral demostró una actividad superior a las mieles de Quillay y Ulmo usadas como referencia, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ante *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*, mientras que frente al resto de los microorganismos ensayados esta diferencia no es estadísticamente significativa. Esta



información es relevante si se toma en cuenta que, recientemente, se ha reportado miel de Ulmo cuya actividad contra bacterias como *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y diferentes tipos de *Staphylococcus aureus* (Acevedo et al., 2017) supera la actividad descrita para la miel de Manuka (Al-kafaween y Nagi Al-Jamal, 2022), dicho esto, y al ser esta una miel utilizada como sujeto de comparación en este estudio, se puede inferir que toda actividad igual o superior obtenida en el resto de las mieles ante esas bacterias es relevante dado el potencial biotecnológico, clínico y alimenticio que poseen.

Además, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Acevedo et al., 2017. Con respecto a la actividad demostrada por la miel de Ulmo ante *Klebsiella pneumonia*, esta es una bacteria categorizada como “*Multidrug-resistant*” o MDR por sus siglas en inglés; se puede encontrar en mucosas animales y libre en el ambiente, igualmente, en humanos se encuentra concentrada dentro del tracto intestinal, lo que causa infecciones en caso de ingresar al torrente sanguíneo (Wang et al., 2020).

Actualmente, es una bacteria que se puede encontrar en ambientes intrahospitalarios, por esta razón, su resistencia a antibióticos ha aumentado con el tiempo y dificultado su tratamiento. El descubrimiento de nuevas sustancias que permitan el control de este tipo de bacterias, tal como lo ha sido la miel de Ulmo (Acevedo et al., 2017) y la miel multifloral de este ensayo, amplían el abanico de alternativas para tratamientos futuros, así como la búsqueda de nuevos mecanismos para su manejo.

Respecto de la información encontrada en bibliografía sobre la actividad de la miel de Quillay ante *E. coli* y *P. aeruginosa*, se ha encontrado que ésta es estadísticamente superior a la descrita en la miel de Ulmo (Velásquez et al., 2019), mientras que, contrario a aquello, en los resultados obtenidos a raíz de este estudio la miel de Ulmo presentó mayor actividad ante *P. aeruginosa* que la miel de Quillay, y ambas fueron estadísticamente similares ante *E. coli*, esta diferencia puede deberse a diversos factores, tales como la pureza de la miel, la temporada de cosecha, o la contribución de especies secundarias dentro de su composición que podrían generar sinergias positivas y/o negativas para las propiedades de la miel (Muñoz et al., 2023). Sin embargo, se aprecia que las concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas de esta miel sí concuerdan con lo descrito en literatura en comparación con la miel de Ulmo, en este

caso, nuestros resultados de CMI y CMB indican menores concentraciones para la miel de Quillay ante *E. coli*; que estas mieles utilizadas como sujeto de comparación hayan demostrado actividad dentro de los rangos descritos en investigaciones anteriores es un buen indicador para el resto de las mieles analizadas que, al mantenerse en rangos estadísticamente similares, se posicionan como nuevas alternativas de análisis dada su actividad antibacteriana en bacterias *Gram positivas* y *Gram negativas*, además de otorgar un valor agregado a estas mieles recientemente descubiertas, al aportar con mayor información acerca de sus propiedades y los beneficios de su uso alimenticio.

El efecto antibacteriano de la miel se ha atribuido con anterioridad a diversas propiedades dentro de su composición, entre ellas, la presencia de peróxido de hidrógeno, potentes antioxidantes, su alto contenido de azúcares y su bajo pH (Almasaudi, 2021; Moussa et al., 2012). En este caso, se analizaron el contenido de peróxido de hidrógeno y de compuestos fenólicos totales, con el fin de determinar si existe alguna relación entre estos con la actividad antibacteriana que han demostrado estas mieles, además de la determinación de ciertas propiedades fisicoquímicas que podrían estar relacionadas.

Debido a que el peróxido de hidrógeno se encuentra directamente relacionado con la capacidad antibacteriana de algunas mieles, se analizó la acumulación de éste para un periodo total de 24 horas. La mayor acumulación para todas las mieles se produjo entre las dos y las seis horas de transcurrido el experimento, basándonos en esta información, si en esos intervalos de tiempo luego de la dilución se analiza la capacidad de la miel para inhibir el desarrollo bacteriano, debería mostrar una inhibición aun mayor a la observada producto de la actividad de la enzima glucosa oxidasa, sin embargo, son necesarios más estudios (tales como una nueva determinación de halos de inhibición) para determinar si las concentraciones obtenidas en todas las mieles a las dos y seis horas están, o no, relacionadas con la actividad que se ha descubierto en esta investigación. Que exista acumulación de peróxido de hidrógeno con el tiempo es un indicador de que hay actividad de la enzima glucosa oxidasa y, eventualmente, podría estar relacionada con las propiedades antibacterianas de estas mieles, dichas propiedades podrían ser determinadas a partir de un análisis de la actividad

antibacteriana a diferentes horas tras realizada la dilución, de esta manera se podría analizar la inferencia que posee la acumulación de peróxido de hidrógeno en la actividad antibacteriana de estas mieles, y, en caso de no existir relación, poder guiar la investigación a través de los otros mecanismos que le otorgan esta propiedad a la miel, como es el caso del metilglioxal, aquellas mieles que no presentan acumulación de peróxido de hidrógeno o que esta no se encuentra directamente relacionada, generalmente, les deben sus propiedades a otros factores, sobre todo, relacionados con las fuentes florales (Majtan et al., 2014). Sin embargo, en este caso, la acumulación de peróxido de hidrógeno sirve como un posible indicador de la ausencia de metilglioxal como parte importante de su composición, pues se ha postulado la posibilidad de que éste inhiba la producción de peróxido de hidrógeno por parte de la enzima glucosa oxidasa (Sindi et al., 2019).

En lo relativo con los compuestos fenólicos totales, estos fueron analizados en diluciones de miel y en extractos metanólicos obtenidos a partir de una columna de filtración, de este modo, esta metodología permite una separación por fases de la miel, de la que un gran porcentaje es retenido en la columna de filtración, mientras que la adición final de metanol permite que se extraiga la mayor cantidad posible de compuestos fenólicos, lo que posibilita que, al momento del análisis, no existan errores relacionados a la lectura producto de la composición química de la miel, que dada su heterogeneidad y variabilidad es propensa a poseer compuestos cuya actividad pueda ser leída en simultáneo, afectando el objetivo del análisis.

Se analizó el efecto de los compuestos fenólicos totales presentes en las mieles para determinar alguna relación con la actividad antibacteriana demostrada, y usarlo como una estimación de la eventual actividad antioxidante que estas mieles pudieran poseer.

En este caso, los resultados obtenidos para la miel monofloral de Ulmo difieren de los encontrados en estudios previos realizados a extractos de la misma miel, en los que se ha encontrado al menos el doble de concentración que en esta investigación (Velásquez et al., 2019), sin embargo, los resultados siguen siendo similares a los encontrados previamente en miel de Manuka ( $83,19 \pm 12,03$  mg GAE/100 g) (Jantakee

& Tragoolpua, 2015) Esta disminución podría deberse a que este análisis, a diferencia de los anteriormente mencionados, se realizó en base a una miel diluida, y no un extracto.

En el caso de la miel de Quillay, los resultados obtenidos difieren levemente de estudios realizados con anterioridad, en los que se ha descrito, por ejemplo,  $56.6 \pm 0.25$  mg GAE/100 g para mieles monoflorales de esta especie (Bridi et al., 2017). En este estudio se encontraron mayores concentraciones ( $77,1 \pm 2,2$  mg GAE/100), esto podría deberse a que la miel es un producto natural y su composición y propiedades pueden variar por otras razones además de la fuente floral, como las condiciones edafoclimáticas, geográficas o el procesamiento mismo de la miel (Gheldof y Engeseth, 2002).

Las mieles de Ulmo y Quillay poseen propiedades antioxidantes que se ha confirmado están relacionadas con su contenido total de compuestos fenólicos, como ocurre en general con las mieles monoflorales ((Velásquez et al., 2019; Bridi et al., 2017). En este caso, y considerando esta información y los valores obtenidos con los ensayos realizados en miel diluida, es posible estimar propiedades antioxidantes semejantes a las descritas para las dos mieles utilizadas como sujeto de comparación. Con respecto a los extractos, estos arrojaron valores notoriamente inferiores a los descritos en literatura, muy probablemente producto de una mala filtración en la columna de Amberlita XAD-2 o recuperación de los compuestos fenólicos en el proceso realizado con metanol.

En relación con el análisis de las muestras con polivinilpolipirrolidona (PVPP) (ver Tabla 3), este entregó valores negativos para las mieles de Yaqui y multifloral, esta situación puede darse debido a que la miel no es un producto completamente homogéneo y tiende a precipitar pasados unos minutos tras la preparación de la disolución, pudiendo generar lecturas erróneas. Para el resto de las mieles, tras la adición de PVPP se puede observar una disminución de las concentraciones obtenidas, esto nos indica que tanto en la dilución de miel como en los extractos metanólicos elaborados a partir de ellas, podría existir una importante influencia de compuestos no fenólicos que alteran la lectura de la muestra (Bridi et al., 2017).

Con respecto a los parámetros fisicoquímicos de las muestras de miel analizadas, estas cumplen tanto con los parámetros entregados por el Instituto Nacional de

Normalización y el Reglamento Sanitario de los Alimentos en Chile, homologado con el *Codex Alimentarius*.

## 7 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación permiten concluir en relación con las hipótesis que se han propuesto, que las mieles de *Eucryphia glutinosa*, *Colletia hystrix* y *Weinmannia trichosperma* poseen actividad antibacteriana significativa al igual que la miel de *Quillaja saponaria*, ante las diferentes bacterias analizadas.

Las mieles de *Eucryphia glutinosa*, *Colletia hystrix* y *Weinmannia trichosperma* poseen actividad antibacteriana inferior a la miel de *Eucryphia cordifolia*, ante las bacterias *Pseudomona aeruginosa* y *Enterobacter cloacae*.

La miel multifloral utilizada en este estudio demostró actividad estadísticamente significativa a la obtenida con las mieles monoflorales y aquellas utilizadas como comparación ante las bacterias *Klebsiella pneumonia* y *Staphylococcus aureus*

Los resultados obtenidos en el análisis de compuestos fenólicos totales indican concentraciones similares entre las mieles en estudio y aquellas utilizadas como comparación, esto sugiere que las mieles en estudio podrían poseer actividad antioxidante similar a la descrita para mieles de Ulmo y Quillay, debido a que, en la gran mayoría de las mieles monoflorales, su actividad antioxidante se relaciona directamente con la concentración de compuestos fenólicos.

Con respecto al análisis fisicoquímico, podemos concluir que todas las mieles cumplen con los estándares establecidos por el INN y el RSA homologado al *Códex Alimentarius*.

Finalmente, la presente investigación entrega información sobre la capacidad antibacteriana de las mieles recientemente descubiertas de Guindo Santo, Tineo, Yaqui y multifloral, las que presentan actividad antibacteriana en todos los ensayos realizados, principalmente la miel multifloral, ésta presenta una actividad estadísticamente significativa si se compara con las mieles de Ulmo y Quillay, destacando los resultados obtenidos ante *Klebsiella pneumonia*. Además, se logró determinar un aumento en la

concentración de peróxido de hidrógeno con el tiempo, que en próximos estudios podría evidenciar un aumento en la actividad antibacteriana descubierta en esta investigación. En relación con los compuestos fenólicos totales, se lograron determinar para las mieles en estudio y aquellas usadas como comparación, los resultados obtenidos indican que podría existir actividad antioxidante similar en todas las mieles, son necesarios estudios posteriores para corroborar esta aseveración.

## 8 REFERENCIAS

- Acevedo, F., Torres, P., Oomah, B., Matias, S., Prado, A., Martín-Venegas, E., . . . Rubilar, M. (2017). Volatile and non-volatile/semi-volatile compounds and in vitro bioactive properties of Chilean Ulmo (*Eucryphia cordifolia* Cav.) honey. *Food Research International*, *94*, 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.01.021>.
- Al-kafaween, M., & Nagi Al-Jamal, H. (2022). A comparative study of antibacterial and antivirulence activities of four selected honeys to Manuka honey. *Iranian Journal of Microbiology*, *2*, 238-251. <https://doi.org/10.18502/ijm.v14i2.9193>.
- Allen, K., Molan, P., & Reid, G. (1991). A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *43*(12), 817–822. doi:<https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1991.tb03186.x>
- Almasaudi, S. (2021). The antibacterial activities of honey. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*(4), 2188-2196.
- Almasaudi, S., Al-Nahari, A., Abd El-Ghany, E., Barbour, E., Al Muhayawi, S., Al-Jaouni, S., . . . Harakeh, S. (2017). Antimicrobial effect of different types of honey on *Staphylococcus aureus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *24*(6), 1255–1261. doi:<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.08.007>
- Alvarez-Suárez, J., Gasparri, M., Forbes-Hernández, T., Mazzoni, L., & Giampieri, F. (2014). The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. *Foods*, *3*(3), 420-432; <https://doi.org/10.3390/foods3030420>.
- Álvarez-Suárez, J., Tulipani, S., Díaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., . . . Battino, M. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *48*(8-9), 2490–2499. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.021>
- Benoit, L. (1989). *Libro rojo de la flora terrestre de Chile*. Corporación Nacional Forestal (CONAF).
- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., & Maffei, R. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, *533*(2), 185–191. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.11.010>
- Bischeimer, M. (2012). *Flores de la Patagonia argentina. Flores nativas y exóticas presentes en los ambientes cordilleranos y precordilleranos de la Patagonia argentina*. Serie Patagonia.

- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. (2008). Honey for Nutrition and Health: A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27, 677-689. <https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719745>.
- Bridi, R., Núñez-Quijada, G., Aguilar, P., Martínez, P., Lissi, E., Giordano, A., & Montenegro, G. (2017). Differences between phenolic content and antioxidant capacity of quillay Chilean honeys and their separated phenolic extracts. *Ciencia e Investigación Agraria*, 44(3), 251-25.
- Córdova-Córdova, C., Ramírez-Arriaga, E., Martínez-Hernández, E., & Zaldivar-Cruz, J. (2013). Botanical characterisation of honey (*Apis mellifera* L.) from four regions of the state of Tabasco, Mexico, by means of melisopalynological techniques. *Universidad y ciencia*, 29(2), 163-178. 10.19136/ERA.A29N2.51.
- Fernandez, N. (2019). *Análisis melisopalínológico y fisicoquímico de mieles producidas en la región andina de la provincia del biobío, Chile*. Tesis, Universidad de Concepción.
- Fundación para la Innovación Agraria [FIA]. (2017). *Buenas prácticas de recolección sustentable para productos forestales no madereros Quillay {Quillaja saponaria Mol.}: cuaderno para recolectoras y recolectores*. FIA.
- Gajardo-Rojas, M., Muñoz, A., Barichivich, J., Klock-Barría, K., Gayo, E., Fontúrbel, F., . . . Veas, C. (2022). Declining honey production and beekeeper adaptation to climate change in Chile. *Progress in Physical Geography: Earth and Environment*, 46(5), 737–756. <https://doi.org/10.1177/03091333221093757>.
- García, N., & Ormazabal, C. (2008). *Árboles nativos de Chile*. Enersis S.A.
- Gheldof, N., & Engeseth, N. (2002). Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3050–3055. doi:<https://doi.org/10.1021/jf0114637>
- Hechenleitner, V., Gardner, M., Thomas, P., Echeverría, C., Escobar, B., Brownless, P., & Martínez, C. (2005). *Plantas amenazadas del Centro-Sur de Chile: distribución, conservación y propagación*. Universidad Austral de Chile y Real Jardín Botánico de Edimburgo.
- Instituto Nacional de Normalización [INN]. (2006a). *NCh3026:2006. Miel de abejas - Determinación del contenido de agua*. Obtenido de <https://ecommerce.inn.cl/nch3026200645100>
- Instituto Nacional de Normalización [INN]. (2006b). *NCh3019:2006. Miel de abejas - Determinación de la acidez libre*. Obtenido de <https://ecommerce.inn.cl/nch3019200645095>



- Instituto Nacional de Normalización [INN]. (2006c). *NCh3046:2007. Miel de abejas - Determinación del contenido de hidroximetilfurfural - Método de espectrofotometría UV*. Obtenido de <https://ecommerce.inn.cl/nch3046200745164>
- Instituto Nacional de Normalización [INN]. (2007a). *NCh3064:2007. Miel de abejas - Determinación de la conductividad eléctrica*. Obtenido de <https://ecommerce.inn.cl/nch3064200745191>
- Instituto Nacional de Normalización [INN]. (2007b). *NCh3102:2007. Miel de abejas - Determinación de ceniza*. Obtenido de <https://ecommerce.inn.cl/nch3102200745249>
- Instituto Nacional de Normalización [INN]. (2007c). *NCh3047:2007. Miel de abejas - Determinación del contenido de sólidos insolubles en agua*. Obtenido de <https://ecommerce.inn.cl/nch3047200745165>
- Jantakee, K., & Tragoolpua, Y. (2015). Activities of different types of Thai honey on pathogenic bacteria causing skin diseases, tyrosinase enzyme and generating free radicals. *Biological Research*, 1-11.
- Johnston, M., McBride, M., Dahiya, D., Owusu-Apenten, R., & Nigam, P. (2018). Antibacterial activity of Manuka honey and its components: an overview. *AIMS Microbiology*, 4(4), 655–664. doi:<https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.655>
- Kwakman, P., & Zaat, S. (2012). Antibacterial components of honey. *IUBMB life*, 64(1), 48–55. doi:<https://doi.org/10.1002/iub.578>
- Kwakman, P., & Zaat, S. (2012). Antibacterial components of honey. *IUBMB Life*, 64(1), 48-55. 10.1002/iub.578.
- Kwakman, P., Te Velde, A., de Boer, L., Vandenbroucke-Grauls, C., & Zaat, S. (2011). Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity. *PloS One*, 6(3), e17709. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017709>
- Libonatti, C., Soledad, V., & Marina, B. (2014). Antibacterial activity of honey: A review of honey around the world. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 6(3), 51-56. <https://doi.org/10.5897/JMA2014.0308>.
- Majtan, J., Bohova, J., Prochazka, E., & Kludiny, J. (2014). Methylglyoxal May Affect Hydrogen Peroxide Accumulation in Manuka Honey Through the Inhibition of Glucose Oxidase. *Journal of Medicinal Food*, 17(2), 290-293.<http://doi.org/10.1089/jmf.2012.0201>.
- Martcorena, C., & Quezada, M. (1985). Catálogo de la flora vascular de Chile. *Gayana Botánica*, 42, 1-157.

- Martin, R., & Bachman, M. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 4. doi:<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>
- Ministerio de Salud [MINSAL]. (2011). *Quillay*. Obtenido de <https://www.minsal.cl/portal/url/item/7d99ff5a5822dbd7e04001011f016dc3.pdf>
- Molan, P., & Cooper, R. (2000). Honey and sugar as a dressing for wounds and ulcers. *Tropical Doctor*, 30(4), 249–250. doi:<https://doi.org/10.1177/004947550003000429>
- Montenegro, G., & Ortega, X. (2011). *Patente nº WO2011057421A2*.
- Montenegro, G., Salas, F., Peña, R., & Pizarro, R. (2009). Antibacterial and antifungic activity of the unifloral honeys of *Quillaja saponaria*, an endemic Chilean species. *Phyton*, 78(1), 141-146. doi:<https://doi.org/10.32604/phyton.2009.78.141>
- Moussa, H., Noureddine, D., Abdelmelek, M., & Saad, A. (2012). Antibacterial activity of various honey types of Algeria against Pathogenic Gram–Negative Bacilli: *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 211-214. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60048-6](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60048-6).
- Muñoz, M., del Sol, M., & Vásquez, B. (2023). Antibacterial and wound-healing action of Ulmo honey (*Eucryphia cordifolia*) of differing degrees of purity. *Frontiers in Veterinary Science*, 10.3389/fvets.2023.1172025.
- Pećanac, M., Janjić, Z., Komarcević, A., Pajić, M., Dobanovacki, D., & Misković, S. (2013). Burns treatment in ancient times. *Medicinski Pregled*, 66(5-6), 263–267.
- Persano, L., & Piro, R. (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, 35(1), S38–S81. doi:<https://doi.org/10.1051/apido:2004049>
- Poussart, E. (1902). *Contribución al estudio de la Colletia spinosa lam., espina cruz*. [Tesis doctoral]. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires.
- Rodríguez, R. (2004). *Monografía. Guindo Santo (Eucryphia glutinosa). Especie con problemas de conservación en Chile*. ENDESA.
- Rodríguez, R., Matthei, O., & Quezada, M. (1983). *Flora arbórea de Chile*. Editorial de la Universidad de Concepción.
- Schencke, C., Vasconcellos, A., Salvo, J., Veuthey, C., & del Sol, M. (2015). Efecto cicatrizante de la miel de Ulmo (*Eucryphia cordifolia*) suplementada con ácido ascórbico como tratamiento en quemaduras. *International Journal of Morphology*, 33(1), 137-143. doi:<https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022015000100022>
- Sindi, A., van Bawi, M., Escorcía, M., Green, K., Khairul, M., Locher, C., & Hammer, K. (2019). Anti-biofilm effects and characterisation of the hydrogen peroxide activity

- of a range of Western Australian honeys compared to Manuka and multifloral honeys. *Scientific Reports* , <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54217-8>.
- Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 229, 152-178.  
doi:[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Velásquez, P., Montenegro, G., Giordano, A., Retamal, M., & Valenzuela, L. (2019). Bioactivities of phenolic blend extracts from Chilean honey and bee pollen. *CyTA - Journal of Food*, 17, 754-762. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1646808>.
- Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>.
- White, J. (1978). Honey. *Advances in Food Research*, 24, 287-374.  
[https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60160-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60160-3).

## ANEXO

Figura 4

*Composición polínica de la miel multifloral.*

Familia	Espectro polínico	Nombre común	N° Pollen	% Presencia	Hábito	Origen
Boraginaceae	Echium vulgare	Hierba Azul	250	19%	Herbáceo	Adventicia
Fabaceae	Galega officinalis	Galega	335	25%	Herbáceo	Adventicia
Lamiaceae	Mentha pulegium	Poleo	156	12%	Herbáceo	Adventicia
Myrtaceae	Luma apiculata	Arrayán	179	13%	Arbóreo	Endémica
Escalloniaceae	Escallonia revoluta	Lun	85	6%	Arbóreo	
Asteraceae			42	3%	Herbáceo	
Boraginaceae	Selkirkia berteroi		66	5%	Arbóreo	Endémica
Fabaceae	Lotus pedunculatus	Lotus	74	6%	Herbáceo	Adventicia
Fabaceae	Trifolium pratense	Treból rojo	19	1%	Herbáceo	Adventicia
Apiaceae	Conium maculatum	Cicuta	29	2%	Herbáceo	Adventicia
Brassicaceae	Brassica napus	Raps	22	2%	Herbáceo	Adventicia
Fabaceae	Sophora macrocarpa	Mayo	33	2%	Arbóreo	Endémica
	Otros		42	3%		
<b>Total</b>			<b>1332</b>	<b>100%</b>		

Cuestionario de auto reporte sobre contribuciones primarias y secundarias a los Objetivos de Desarrollo Sostenible, organizados por categorías.

En caso de que aplique, marque con una "X" un único Objetivo de Desarrollo Sostenible como aporte principal y otro objetivo como aporte secundario.

Bloques	Objetivos	1°	2°
Personas	1. Poner fin a la pobreza en todas sus formas y en el mundo.		
	2. Poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible	X	
	3. Garantizar una vida sana y promover el bienestar de todos y todas las edades.		X
	4. Garantizar una educación inclusiva y equitativa de calidad y promover oportunidades de aprendizaje permanente para todos.		
	5. Lograr la igualdad de género y empoderar a todas las mujeres y las niñas.		
Planeta	6. Garantizar la disponibilidad y la gestión sostenible del agua y el saneamiento para todos.		
	12. Garantizar modalidades de consumo y producción sostenible.		
	13. Adoptar medidas urgentes para combatir el cambio climático y sus efectos.		
	14. Conservar y utilizar sosteniblemente los océanos, los mares y los recursos marinos para el desarrollo sostenible.		
	15. Proteger, restablecer y promover el uso sostenible de los ecosistemas terrestres, gestionar sosteniblemente los bosques, luchar contra la desertificación, detener e invertir la degradación de las tierras y detener la pérdida de biodiversidad.	X	
Prosperidad	7. Garantizar el acceso a una energía asequible, fiable, sostenible y moderna para todos.		
	8. Promover el crecimiento económico sostenido, inclusivo y sostenible, el empleo pleno y productivo y el trabajo decente para todos.		
	9. Construir infraestructuras resilientes, promover la industrialización inclusiva y sostenible y fomentar la innovación.		X
	10. Reducir la desigualdad en los países y entre ellos.		
	11. Lograr que las ciudades y los asentamientos humanos sean inclusivos, seguros, resilientes y sostenibles.		
Paz	16. Promover sociedades pacíficas e inclusivas para el desarrollo sostenible, facilitar el acceso a la justicia para todos y construir a todos los niveles institucionales eficaces e inclusivas que rindan cuentas.		
Asociaciones	17. Fortalecer los medios de implementación y revitalizar la Alianza Mundial para el Desarrollo Sostenible		

Debe adjuntar este documento a su trabajo de tesis, tesina o memoria.