

**CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA MIEL DE
TETRAGONISCA ANGUSTULA (LATREILLE, 1811) (Apidae: Apinae: Meliponini)
EN EL CHACO CHUQUISAQUÑO**

**MICROBIOLOGICAL QUALITY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HONEY FROM
TETRAGONISCA ANGUSTULA (LATREILLE, 1811) (Apidae: Apinae: Meliponini) IN THE
CHUQUISAQUÑO CHACO REGION**

GALARZA BALDERAS Andrea Leonarda

*Carrera de Biología
Facultad de Ciencias, Químico Farmacéuticas y Bioquímicas
Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca*

DE LA CRUZ-CLAURE María Luisa

*Instituto Experimental de Biología "Luis Adam Briançon"
Facultad de Ciencias, Químico Farmacéuticas y Bioquímicas
Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca*

LOVERA CRUZ Roxana

*Carrera de Biología
Facultad de Ciencias, Químico Farmacéuticas y Bioquímicas
Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca*

SERRUDO FLORES María Mercedes

*Carrera de Biología
Facultad de Ciencias, Químico Farmacéuticas y Bioquímicas
Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca*

RAMOS CASTRO Adela

*Instituto Experimental de Biología "Luis Adam Briançon"
Facultad de Ciencias, Químico Farmacéuticas y Bioquímicas
Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca*

CADIMA VELARDE Ivonne

*Carrera de Bioquímica
Facultad de Ciencias, Químico Farmacéuticas y Bioquímicas
Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca*

CUENCA SANABRIA Javier Hernán

*Instituto Experimental de Biología "Luis Adam Briançon"
Facultad de Ciencias, Químico Farmacéuticas y Bioquímicas
Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca*

CESPEDES-LLAVE Ariel Angel

*Instituto Experimental de Biología "Luis Adam Briançon"
Facultad de Ciencias, Químico Farmacéuticas y Bioquímicas
Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca*

cespedes.ariel@usfx.bo

Sucre, Bolivia

Recibido en 06 de septiembre de 2021
Aceptado en 20 de septiembre de 2021



RESUMEN

Se estudiaron la miel producida por *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) (*Apidae: Apinae: Meliponini*) correspondientes a 46 muestras de miel provenientes de meliponarios, en diez localidades dentro el Parque Nacional y Área natural de manejo Integrado Serranía del Iñao y dos fuera de ella, abarcando los municipios de Monteagudo y Villa Vaca Guzmán (Muyupampa). Para ello, se utilizaron métodos estandarizados para recolectar muestras de miel de cajas racionales y otros del centro de acopio en Muyupampa. En el laboratorio, se llevaron a cabo los análisis de calidad microbiológica usando la Norma Boliviana 38023, además, de ensayos de actividad antimicrobiana frente a la cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*, mediante el método de difusión. Los resultados muestran una calidad microbiológica aceptable en la miel de *Tetragonisca angustula*, salvo por hongos y levaduras en ciertas regiones y etapas productivas. Esto subraya la necesidad de mejorar las prácticas de manejo, especialmente en La Tapera y durante la cosecha, para cumplir normas internacionales. Además, la miel destaca por su actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, superando a veces al control positivo, lo que la posiciona como alternativa frente a la resistencia bacteriana. La miel de *Tetragonisca angustula* tiene calidad microbiológica aceptable y alta actividad antimicrobiana, resaltando su potencial frente a bacterias resistentes.

Palabras clave: Abejas sin aguijón, Chaco Chuquisaqueño, Propiedades bioactivas

ABSTRACT

Honey produced by *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) (*Apidae: Apinae: Meliponini*) was analyzed using 46 honey samples collected from meliponaries located in ten sites within the Serranía del Iñao Protected Area and two outside, covering the municipalities of Monteagudo and Villa Vaca Guzmán (Muyupampa). Standardized methods were employed to collect honey samples from rational hives and the Muyupampa collection center. In the laboratory, microbiological quality analyses were performed following the Bolivian Standard 38023, along with antimicrobial activity assays against the ATCC 25923 strain (*Staphylococcus aureus*) using the diffusion method. The results revealed acceptable microbiological quality in *Tetragonisca angustula* honey, except for yeast and mold counts in certain regions and production stages. This highlights the need to improve handling practices, particularly in La Tapera and during harvesting, to meet international standards. Additionally, the honey demonstrated remarkable antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, sometimes surpassing the positive control, positioning it as a promising alternative in combating bacterial resistance. *Tetragonisca angustula* honey exhibits acceptable microbiological quality and high antimicrobial activity, underscoring its potential against resistant bacteria.

Key words: Stingless bee, Chaco Chuquisaqueño, Bioactive properties

INTRODUCCIÓN

Los productos derivados de las abejas sin aguijón (*Apidae: Apinae: Meliponini*), como la miel y el propóleo, han sido utilizados por la humanidad desde tiempos ancestrales como alimentos y en medicina (Hrncir *et al.* 2016; Michener 2013; Powell *et al.* 2014).

Estas abejas recolectan néctar, polen y resinas de la vegetación natural y los transforman en miel mediante la acción de sus jugos intestinales, ricos en enzimas y microbiota (D'Alvise *et al.* 2018; Grajales *et al.* 2018). Las propiedades biológicas de la miel, como su actividad antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria y

antitumoral, están directamente relacionadas con su composición química, que varía según su origen geográfico y floral (Berretta *et al.* 2020; Gonçalves *et al.* 2005; Miorin *et al.* 2003; Popova *et al.* 2007; Salatino *et al.* 2011)

En el ámbito global, las abejas sin aguijón, como *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) ha ganado atención por los beneficios medicinales y nutritivos de sus productos (DeMera & Angert 2007; Pucciarelli *et al.* 2014; de Sousa Silveira *et al.* 2024). Esta especie producen miel con características distintivas como la detección de compuestos fenólicos, lo que le otorga propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Braghini *et al.* 2021; DeMera & Angert 2007; Lima *et al.* 2024). Además, estudios han evidenciado su efectividad frente a microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* (Kenji Nishio *et al.* 2016; Miorin *et al.* 2003; Nishio *et al.* 2016; Torres *et al.* 2018)

A nivel internacional, la calidad de la miel es regulada mediante normativas como el Codex Alimentarius, que establece parámetros físico-químicos y microbiológicos específicos (Cárdenas *et al.* 2008; FAO-OMS 2000). Aunque estas regulaciones suelen aplicarse a *Apis mellifera*, países como Brasil y Argentina han desarrollado normas específicas para las mieles de abejas sin aguijón (ADEPARÁ 2021; CONAL 2019a). En Bolivia, investigaciones iniciales han caracterizado la miel de meliponinos en términos de calidad físico-química y

microbiológica como el trabajo pionero realizado por Ferrufino y Vit (2013), pero todavía no profundizan en aspectos microbiológicos y bioactivos relevantes para su aplicación en medicina natural.

A pesar de ello en Bolivia, la meliponicultura se ha desarrollado como una alternativa económica sostenible desde 2004 (Martínez & Cuéllar 2004; Tejada 2006). Pero en el Chaco Chuquisaqueño la meliponicultura tiene un notable impacto con una producción que beneficia económicamente a comunidades de origen Guaraní y donde iniciativas de ONG's han fomentado su práctica (Delgado & Martínez 2021; MP 2020). La producción de miel en esta región tiene un enfoque medicinal, especialmente por las propiedades bioactivas de las mieles de *Tetragonisca angustula* (Adler *et al.* 2023, 2024).

En este estudio se evaluó la calidad microbiológica y la actividad antimicrobiana de la miel producida por *Tetragonisca angustula* en el Chaco Chuquisaqueño, específicamente en Parque Nacional y Área de Manejo Integrado Serranía del Iñaño. Para la calidad microbiológica se comparó en la cadena productiva (manejo cajas racionales, cosechada y acopiada-almacenada) utilizando los estándares de la NB 38023 para la miel (creada para *Apis mellifera*) y normas específicas para abejas sin aguijón (Argentina, Brasil y Ecuador). Y la actividad antimicrobiana se probó ante la cepa de ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*. Este trabajo

busca contribuir al conocimiento sobre su calidad y uso medicinal de la miel de *Tetragonisca angustula*, considerando su potencial para aplicaciones en salud y su importancia en la economía local.

MÉTODOS

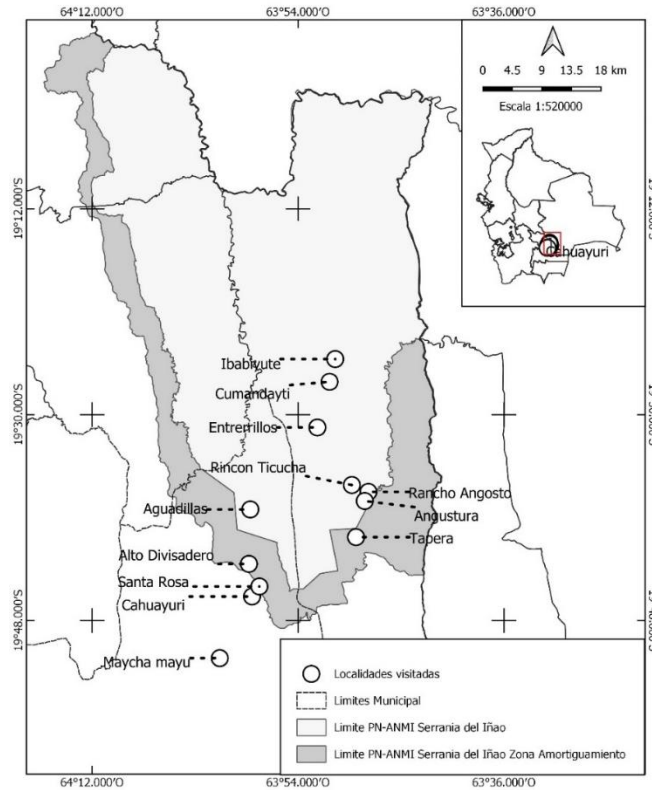
Área de Estudio: El estudio se realizó en diez localidades del Parque Nacional y Área de Manejo Integrado Serranía del Iñao. El área protegida está ubicada en el departamento de Chuquisaca y es parte del Chaco Chuquisaqueño. Se encuentra distribuido en las jurisdicciones de los municipios de Villa Vaca Guzmán, Monteagudo, Padilla y Villa Serrano, los que conforman la denominada Mancomunidad de Municipios de Iñao (SERNAP 2015) (ver figura 1).

Las características geomorfológicas del área protegida es una región montañosa del subandino caracterizado por la presencia de un conjunto de serranías altas, macizas, escarpadas, paralelas y orientadas en sentido norte - sur donde se destacan las serranías del Iñao en la región central, Yahuañanca hacia el este y Khaska orkho en el noroeste (SERNAP 2015). El rango altitudinal oscila entre

los 600 y 2800 m sobre el nivel del mar, la temperatura varía entre los 14 a 24 °C y precipitaciones que alcanza desde los 900 a 1200 mm anualmente (Navarro 2002).

Desde el año 2005, la Fundación PASOS ha trabajado en emprendimientos de meliponicultura en comunidades del Parque Nacional y Área Natural de Manejo Integrado Serranía del Iñao (PN-ANMI Serranía del Iñao), promoviendo el liderazgo y la autonomía económica de las mujeres indígenas y campesinas (PASOS 2015). Este esfuerzo ha mejorado las prácticas de producción de miel de abejas sin aguijón, creando asociaciones conformadas principalmente por mujeres y beneficiando a más de 300 personas (Delgado & Martínez 2021). Estas comunidades representan puntos clave para la meliponicultura en el Chaco Chuquisaqueño debido a su biodiversidad rica y un entorno favorable para la cría de abejas sin aguijón, particularmente *Tetragonisca angustula*.

Figura 1. Mapa del área protegida PN -ANMI Serranía del Iñao, mostrando los límites del área protegida más la zona de amortiguamiento, además de las localidades donde se realizó el proyecto.



Fuente: Elaboración propia.

Colecta de las muestras de miel.

La recolección de 46 muestras miel para este estudio se llevó a cabo en dos periodos. La primera etapa se realizó en diciembre de 2020, durante la cual se obtuvieron 11 muestras de cajas racionales en nueve comunidades para los bioensayos de actividad antimicrobiana. Cinco de estas comunidades están ubicadas dentro del PN-ANMI Serranía del Iñao (Aguadillas, Charahuilla (Cumandayti), Entierillos, Rincón Ticucha y Angostura), dos en la zona de amortiguamiento del área protegida (Alto Divisadero y La Tapera) y tres fuera del área protegida (Santa Rosa, Cahuayuri y Maycha Mayu).

La segunda etapa tuvo lugar en mayo de 2023, recolectándose 35 muestras en tres comunidades. De ellas se obtuvo 21 muestras de cajas racionales en tres comunidades (Machay Mayu, La Tapera, Entierillos), de las mismas comunidades se colectaron seis muestras de miel en envases de su cosecha. Y del centro de acopio ubicado en la ciudad de Monteagudo se obtuvieron ocho muestras (ver tabla 1).

Para la colecta de miel, se emplearon guantes quirúrgicos, frascos esterilizados de vidrio (212 mL) y utilizando jeringas de 10 mL esterilizadas, se extrajeron aproximadamente 100 mL de miel. Cada

muestra de miel fue rotulada con el nombre del meliponicultor, la zona de extracción y la fecha de muestreo. Los frascos conteniendo las muestras fueron

transportados al laboratorio en coolers, manteniéndose refrigerados para su posterior análisis.

Tabla 1. Comunidades donde se realizó la colecta de mieles de *Tetragonisca angustula* para análisis de calidad microbiológica (CM) y bioensayos de actividad antimicrobiana (AA).

Municipio	Comunidades	PN-ANMI Serranía del Iñao		
		Dentro	Amortiguamiento	Fuera
Monteagudo	Aguadillas	AA (n = 1)		
	Alto Divisadero		AA (n = 1)	
	Santa Rosa			AA(n = 1)
	Cahuayuri			AA (n = 1)
	Maycha Mayu			AA(2) CM (6)
	Centro de acopio			AA (n = 1) CM (n= 8)
Villa Vaca Guzmán (Muyupampa)	Cumandayti	AA (n = 1)		
	Entierrillos	CM (7)		
	Rincon Ticucha	AA (n = 1)		
	Angostura	AA (n = 1)		
	La Tapera		AA (1), CM (13)	

Fuente: Elaboración propia.

Calidad microbiológica

Para ello se utilizaron dos métodos: La técnica del número más probable (NMP) y técnica de recuento en placa. Se aplicó el NMP, siguiendo la NB 32003 y 32005, que estima la densidad de microorganismos, como aerobios mesófilos y coliformes totales, en una muestra mediante diluciones seriadas y observación de crecimiento en medios específicos. Se trabajó con la muestra tal cual y diluciones obtenidas a partir de una mezcla 1 mL de muestra con 9 mL de agua peptonada estéril para obtener la dilución inicial 1/10 y llevando de esta 1 mL en 9 mL de agua peptonada hasta obtener las diluciones decimales (1/100, 1/1000). Cada dilución se inoculó en tubos con caldo lactosado (tres réplicas

por dilución) y se incubaron a 35-37 °C por 24-48 horas. Los tubos positivos se identificaron por la formación de gas, turbidez y se repicaron en caldo bilis verde brillante. Los resultados se interpretaron mediante tablas del NMP, calculando la concentración microbiana en la muestra original.

Para la técnica de recuento en placa, se empleó la NB 32006 la cual consistió en cuantificar microorganismos como hongos filamentosos y levaduras en una muestra miel. El proceso consistió en mezclar 1 mL de la muestra con 9 mL de agua peptonada estéril para obtener la solución 1/10 y a partir de esta se obtuvo las diluciones seriadas (1/100 y 1/1000). Estas diluciones se inocularon en placas de Petri con medios

específicos: agar Sabouraud (hongos y levaduras), Las placas se incubaron a 25 °C hasta 5 días, al cabo de este tiempo se realizó el conteo de las colonias formadas en cada dilución y los resultados se expresaron como Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro o gramo de muestra. Luego de este proceso se compararon con valores estandarizados de calidad de miel de la NB 38023 y otras normas específicas para abejas sin aguijón (Ver tabla 2).

La identificación de *Salmonella* sp se realizó a partir medios de enriquecimiento como el caldo Tetrionato (Britania) incubado a 37°C por 18 a 24 horas y resiembra en agar *Shigella-Salmonella* (Oxoid) y agar MacConkey (Difco) y posterior identificación de colonias lactosa negativas aspecto de ojo de pescado mediante pruebas bioquímicas (TSI/LIA/MIO/U/C). (Ver tabla 2).

Tabla 2. Requisitos microbiológicos de la miel de abeja sin aguijón en cuatro países

Microorganismo	Valores máximos permitidos			
	NB 38023 (Bolivia)	Norma Brasileira	Norma Argentina	Norma Ecuatoriana
Coliformes	Ausencia	1x10 ²	Ausencia	Ausencia
Hongos y levaduras	1x10 ²	1x10 ⁴	1x10 ⁴	1x10 ²
<i>Salmonella</i> sp	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Aerobios mesófilos	1x10 ⁴			

Obtenido de (ADEPARA 2021; CONAL 2019b; IBNORCA 2011; INEN 2016)

Análisis de actividad antimicrobiana.

Se empleó el método de difusión agar por triplicado, entre los reactivos y materiales empleados se tiene el agar Mueller Hinton (Oxoid), agar Mc Conkey (Oxoid), agar manitol (Oxoid), discos estériles de papel filtro de 6 y 10 mm (Sigma Aldrich, USA), disco de amikacina 30ug (Oxoid) frente a la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC25923 y discos de papel filtro sin antibiótico.

A partir de una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 incubada por 24 horas a 37 °C, se estandarizó el inóculo a una concentración 0,5 de la escala de Mc

Farland en el turbidímetro (Biumierux, Francia) y se sembró en agar Mueller Hinton (Oxoid) en los ensayos de susceptibilidad empleando el método difusión. Posteriormente, se aplicaron los discos impregnados con 6, 12.5, 25, 50, 75 µg de miel, el disco de amikacina de 30ug (Oxoid) (control positivo) y disco con solución no antibiótica (control negativo), sobre el agar Mueller Hinton previamente inoculado con la cepa microbiana. Se incubaron a 37 °C por 18 a 24 horas, al cabo de dicho tiempo se midieron y registraron los halos de inhibición.

En la interpretación de los resultados se tomaron como referencia los valores de la Clinical and Laboratory Standards Institute (Tabla 4A1CLSI 2020) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (20-26 mm) disco de amikacina 30ug y registraron las zonas de inhibición de las muestras de mieles en estudio. La comparación con los valores de los halos de inhibición de los discos antibióticos con los halos de la sustancia en estudio, permitió valorar la actividad antibacteriana de las sustancias en estudio.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis exploratorio de cada parámetro microbiológico conforme a la norma NB 38023, considerando las variables de procedencia y etapa de la cadena productiva. La normalidad de las variables analizadas se verificó mediante la prueba de Shapiro-Wilk, la cual indicó que no todas cumplían con este supuesto. Por ello, se procedió a aplicar un análisis inferencial para una muestra, utilizando una prueba de una sola cola con el objetivo de evaluar si las mediciones se encontraban por debajo de los estándares establecidos por la norma.

La actividad antimicrobiana de la miel producida por *Tetragonisca angustula* frente a la cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus* fue evaluada a través de la medición de halos de inhibición (mm). En este análisis, se consideraron dos factores: la procedencia (Localidad) y el Sitio de

almacenamiento, clasificándose en "Almacén", "Dentro", "Fuera" y "Amortiguamiento". Los resultados obtenidos fueron comparados usando una prueba de t-student para una muestra, utilizando una prueba de una sola cola con el objetivo de evaluar si las mediciones de los diferentes pesos de las mieles (6, 12.5, 25, 50 y 75 µg) se encontraban por debajo o encima del control positivo (C+ Amikacina), para evaluar la eficacia antimicrobiana.

Se aplicó una prueba no paramétrica para evaluar el efecto de la procedencia de las mieles sobre la medición de los halos de inhibición obtenidos. Este enfoque fue seleccionado como una alternativa adecuada al análisis paramétrico, dado que los supuestos de normalidad no se cumplieron en los resultados. Posteriormente, se realizó una comparación post-hoc mediante el test de Dunn para identificar diferencias significativas entre los grupos. Todos los análisis fueron realizados con un nivel de confianza del 95% y utilizando el software R (TRF 2018)

RESULTADOS

Calidad microbiológica de la miel de Tetragonisca angustula.

Los resultados se muestran que las mieles según la NB 38023, en tres de los parámetros estuvieron por debajo de los límites permisibles. Como es el parámetro de *Salmonella sp*, donde no se detectó presencia de en ninguna de las muestras, cumpliendo con el criterio normativo de ausencia. Para coliformes totales se observa que los valores

promedio de coliformes totales en todas las procedencias y etapas de la cadena productiva son bajos, cumpliendo con la norma que exige ausencia. Las diferencias estadísticas en las pruebas de Wilcoxon prueban que todos los valores son significativamente distintos de cero, con p -valores inferiores a 0.05 en casi todos los casos, indicando presencia marginal. En particular, los mayores valores promedio (3.85 ± 0.41 UFC/g) se reportaron en La Tapera, mientras que los más bajos (3.22 ± 0.15 UFC/g) en Entierrillos. En la cadena productiva, el acopio (3.75 ± 0.75 UFC/g) presenta valores similares a la cosecha (3.83 ± 0.65 UFC/g), pero de igual manera los valores son bajos.

Con respecto al parámetro aerobios mesófilos, los recuentos en todas las muestras fueron significativamente inferiores al límite máximo permitido de 10,000 UFC/g, con promedios entre 0.67 ± 0.19 y 1.50 ± 0.23 UFC/g. Las pruebas de Wilcoxon ($p < 0.0001$) confirman que

estos valores cumplen ampliamente con los requisitos normativos. Las muestras de Machay Mayu presentaron los valores más bajos, mientras que las de La Tapera mostraron los valores más altos dentro de este rango aceptable. Este mismo aspecto se pudo corroborar en la cadena productiva, valores que cumplen con los requisitos normativos.

Sin embargo, los valores obtenidos para hongos y levaduras presentaron mayor variabilidad, y en algunos casos, superaron el límite permitido de 100 UFC/g. Por procedencia, La Tapera reportó el valor promedio más elevado (617.85 ± 223.12 UFC/g, $p = 0.8780$), lo que sugiere incumplimiento en esta región. En contraste, Entierrillos cumplió con el estándar (62.47 ± 33.69 UFC/g, $p = 1.1E-04$). En cuanto a la cadena productiva, el acopio mostró los niveles más bajos (26.33 ± 20.74 UFC/g), mientras que la cosecha reportó los valores más altos (476.1 ± 308.38 UFC/g, $p = 0.2002$).

Tabla 1. Resumen de los resultados reflejan una calidad microbiológica de cada parámetro según la NB 38023 y para las variables procedencia y etapa de la cadena productiva.

	Coliformes Totales UFC/g	Wilcoxon	Aerobios Mesofilos UFC/g	Wilcoxon	Salmonella	Hongos y Levaduras UFC/g	Wilcoxon	n
	(Media \pm ee)	p valor	(Media \pm ee)	p valor		(Media \pm ee)	p valor	
Localidad								
Entierrillos	3.22 ± 0.15	0.0017	0.71 ± 0.17	<0.0001	Ausencia	62.47 ± 33.69	1.1E-04	8
La Tapera	3.85 ± 0.41	0.0001	1.50 ± 0.23	<0.0001	Ausencia	617.85 ± 223.12	0.8780	13
Machay Mayu	3.40 ± 0.24	0.0184	0.67 ± 0.19	<0.0001	Ausencia	142.55 ± 84.05	0.0101	6

Cadena productiva								
Acopio	3.75 ± 0.75	0.0029	0.92 ± 0.38	<0.0001	Ausencia	26.33 ± 20.74	0.00014	8
Caja	3.48 ± 0.20	<0.0001	0.96 ± 0.14	<0.0001	Ausencia	312.312 ± 116.9	0.03159	21
Cosecha	3.83 ± 0.65	0.0098	1.00 ± 0.29	<0.0001	Ausencia	476.1 ± 308.38	0.20020	6

Fuente: Elaboración propia.

Actividad antimicrobiana de la miel producida por *Tetragonisca angustula*

Los resultados muestran una tendencia clara: el tamaño de los halos de inhibición aumenta con el peso de miel en todas las condiciones evaluadas (Figura 2). Esto indica una relación dosis-respuesta positiva, donde los pesos más altos de miel generan una mayor inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Las mieles obtenidas dentro y fuera del área protegida presentaron los halos más amplios en los pesos más altos (50 y 75 µg), destacando un efecto antimicrobiano significativo en estos contextos.

Por otro lado, las mieles procedentes del centro de acopio y la zona de amortiguamiento del área protegida muestran una actividad más moderada, aunque todavía presentan una respuesta dosis-dependiente. En particular, la miel del centro de acopio exhibe halos más pequeños en comparación con los otros sitios para todos los pesos, lo que podría sugerir diferencias en la calidad o composición de la miel almacenada en este entorno.

Al comparar los halos de inhibición obtenidos con las mieles frente a los valores promedio del control positivo (C+ Amikacina), se observan diferencias interesantes. Las mieles procedentes dentro el área protegida, los pesos de miel de 50 y 75 µg lograron superar el valor de referencia del control positivo (25.6 mm, $p < 0.0001$), lo que sugiere que la miel en estas condiciones tiene una actividad antimicrobiana comparable, o incluso superior, a un antibiótico estándar. Un patrón similar se observa en las mieles procedentes fuera del área protegida, donde los pesos más altos alcanzaron resultados muy cercanos al promedio del control (25.13 mm, $p < 0.0001$).

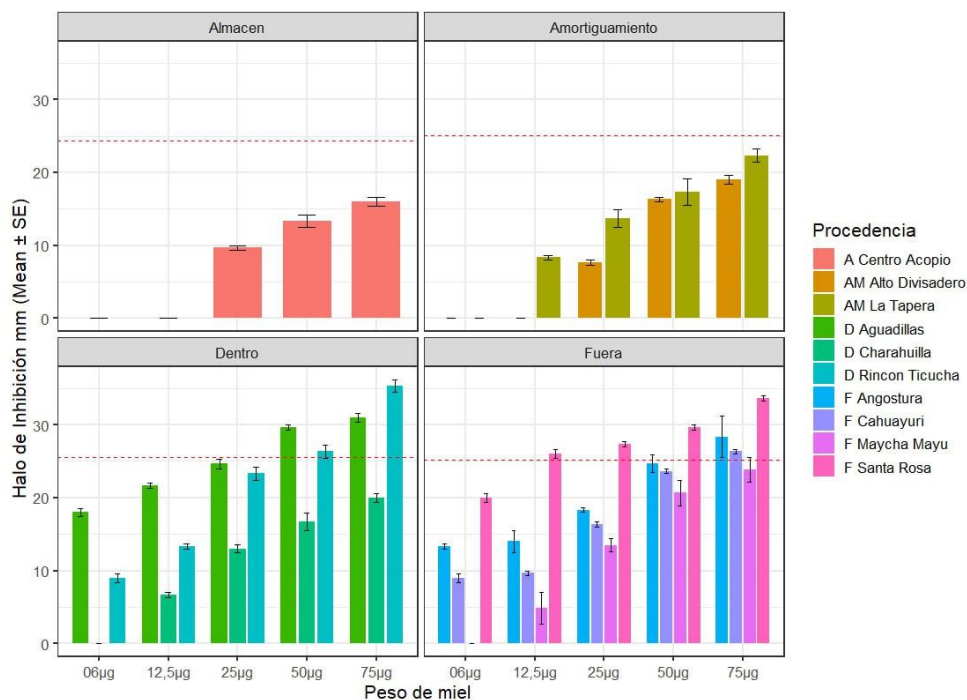
Sin embargo, en las mieles procedentes del centro de acopio y la zona de amortiguamiento del área protegida, los halos de inhibición quedaron por debajo de los valores del control positivo en todos los pesos evaluados ($p < 0.0001$). Esto podría deberse a factores relacionados con la degradación de los compuestos activos de la miel durante el almacenamiento o a diferencias en las condiciones ambientales (por ejemplo, humedad o temperatura), que pueden afectar la potencia antimicrobiana.

Por otra, los resultados del análisis estadístico no paramétrico (prueba de Kruskal-Wallis) muestran diferencias significativas en los halos de inhibición según el sitio de almacenamiento y la localidad de procedencia de la miel ($p < 0.0001$). Esto refuerza la hipótesis de que tanto el entorno de almacenamiento como las condiciones específicas de recolección de la miel influyen en su actividad antimicrobiana.

El análisis post-hoc con la prueba de Dunn reveló diferencias significativas entre las localidades del cual procedente la miel dentro y fuera al área protegida

frente a la miel almacenada. Sin embargo, no se evidenció que exista diferencias entre la miel procedentes de la zona de amortiguamiento del área protegida y la almacenada ($p > 0.0689$). Destacando nuevamente que las localidades Aguadillas, Charahuilla, Rincón Ticucha, Angostura, Cahuayiri, Maycha Mayu y Santa Rosa, posiblemente ofrecen condiciones más favorables para mantener la actividad antimicrobiana de la miel. Esto podría estar relacionado con una menor exposición a condiciones adversas como oxidación o contaminación cruzada.

Figura 2. Diagrama de barras que muestra el promedio (mean) y error estándar (SE) del halo de Inhibición (mm) según el peso de miel (μg) y una línea roja punteada que representa el control positivo de Amikacina. Estos resultados están en base a la procedencia según las localidades obtenidas la miel de *Tetragonisca angustula* y el centro de acopio (A). Además de indicar si estas localidades están fuera (F), dentro (D) y la zona amortiguamiento del área protegida PN-ANMI Serranía del Iñao.



Fuente: Elaboración propia.

DISCUSIÓN

La calidad microbiológica de la miel producida por *Tetragonisca angustula* es esencial para garantizar su seguridad alimentaria y el cumplimiento de estándares internacionales. Como sucede con otros tipos de miel, las cargas microbianas normales en esta miel incluyen bacterias y levaduras provenientes del néctar de las flores y la flora bacteriana y fúngica de las abejas (Lagos Burbano *et al.* 2005). Estas pueden causar fermentación de la miel, aunque la contaminación por hongos patógenos puede deberse principalmente a malas prácticas durante la cosecha (Lagos 2020; Pineda & Isaías 2005).

En este estudio, se evaluaron parámetros microbiológicos específicos en función de la procedencia y etapas de la cadena productiva, tomando como referencia la norma boliviana NB82023 y los estándares internacionales de Brasil (ADEPARA, 2021), Argentina (CONAL, 2019) y Ecuador (INEN, 2016). Los resultados reflejan una calidad aceptable en la mayoría de los parámetros evaluados, pero con áreas críticas que requieren atención.

En coliformes totales y aerobios mesófilos se observaron valores bajos de coliformes totales en todas las muestras, cumpliendo con las normas que exigen su ausencia. Y en la cadena productiva, tanto el acopio como la cosecha mostraron niveles similares, pero siempre dentro de límites aceptables, lo que evidencia un manejo adecuado que

limita la contaminación bacteriana. Lo que concuerda con el trabajo de Ramírez-Miranda *et al.* (2023), donde mencionan que la escasa presencia de coliformes totales y aerobios mesófilos en mieles de abejas sin aguijón, lo que puede sugerir la aplicación de adecuadas prácticas de higiene durante la cosecha y el almacenamiento.

La ausencia de *Salmonella* sp en todas las muestras es también un resultado positivo que refuerza la seguridad microbiológica de la miel de *Tetragonisca angustula*. Esto cumple con los criterios establecidos en normativas de Bolivia, Brasil, Argentina y Ecuador. La seguridad frente a este patógeno es un aspecto fundamental para su consumo y comercialización. Además, estos datos son consistentes con la idea de que las abejas sin aguijón interactúan de forma mutualista con microorganismos benéficos, como bacterias lácticas y levaduras, que contribuyen a la conservación de la miel (Ferrer *et al.*, 2005).

El parámetro de hongos y levaduras mostró mayor variabilidad. Por procedencia, la Tapera presentó valores alarmantemente altos y especialmente en la miel cosechada, lo que sugiere incumplimiento con los estándares, posiblemente debido a condiciones ambientales o malas prácticas. Esta contaminación puede atribuirse a la exposición prolongada a condiciones menos controladas y su alto contenido de humedad (> 20%) y acidez libre (> 40 meq/g) que son propias de estas mieles

según hallazgos en bosques amazónicos (Ferrufino & Vit 2013) y del bosque tucumano (Adler *et al.* 2024) en Bolivia, que estas características favorece a la colonización. Aunque, en las mieles de estas abejas sin aguijón es comprensible encontrar esta contaminación no prospera según Ramírez-Miranda *et al.* (2023) debido a que la actividad antibacteriana de miel puede impedir la supervivencia y el crecimiento de estos microorganismos.

La miel de *Tetragonisca angustula* mostró una destacada actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, en las pruebas de difusión en agar, superando incluso los estándares establecidos para Amikacina (20 – 26 mm) según el CLSI (2020). Sin embargo, los resultados difieren de los reportados por DeMera & Angert (2007), quienes encontraron que la miel de *Tetragonisca angustula* no presentó actividad frente a la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Estas discrepancias pueden atribuirse a las diferencias en las cepas utilizadas; mientras que ATCC 25923, empleada en este estudio, es conocida por ser sensible a la mayoría de los antibióticos, ATCC 6538 puede mostrar una resistencia relativa mayor frente a ciertos agentes antimicrobianos (Furi *et al.* 2013; Makarova *et al.* 2017).

Otros estudios también han evaluado la respuesta de *Staphylococcus aureus*, frente a diferentes concentraciones de miel. Por ejemplo Dardón *et al.* (2012), utilizaron concentraciones superiores al 10%, mientras que Zamora *et al.* (2012)

emplearon miel al 100% con la cepa *Staphylococcus aureus* UCR 2902 (cepa específica identificada y registrada por la Universidad de Costa Rica), encontrando que por debajo del 75% la actividad antimicrobiana disminuye significativamente.

En el presente estudio, no se aplicaron concentraciones debido a que las mieles analizadas presentaban un aspecto diluido con alta humedad (promedio 25.8). Sin embargo, un peso superior a 25 µg mostró una mejor respuesta antimicrobiana en las mieles provenientes de cajas racionales. Por otro lado, se observó que la miel de *Tetragonisca angustula* almacenada durante varios días en frascos de vidrio o plástico puede reducir su actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, lo que coincide con los hallazgos de Martínez *et al.* (2018) y explica los resultados obtenidos en las muestras provenientes del centro de acopio.

CONCLUSIONES

Los resultados reflejan una calidad microbiológica aceptable en la mayoría de los parámetros analizados, con excepción de hongos y levaduras en algunas procedencias y etapas de la cadena productiva. Esto resalta la importancia de implementar prácticas de manejo más rigurosas, especialmente en regiones como La Tapera y durante la cosecha, para garantizar el cumplimiento con las normas internacionales y maximizar la calidad del producto final. La miel de

Tetragonisca angustula demuestra su potencial como un alimento seguro, siempre que se mantengan estándares estrictos de producción y almacenamiento.

Con respecto a las evaluaciones de la actividad antimicrobiana, se destaca el potencial de la miel de *Tetragonisca angustula* como agente antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus*. La capacidad de algunas muestras para igualar o superar la eficacia del control positivo (C+ Amikacina) es particularmente relevante en el contexto de la resistencia bacteriana, ya que sugiere que la miel podría ser utilizada como un tratamiento complementario o alternativo.

Además, el impacto del almacenamiento y la procedencia de la miel en su actividad antimicrobiana resalta la necesidad de implementar prácticas de manejo estandarizadas para preservar la calidad del producto. Es fundamental realizar un control fisicoquímico de parámetros clave, como la humedad, ya que esta influye en la proliferación de hongos y mohos, además de afectar las

características propias de la miel, que tiende a ser bastante líquida. Esto incluye un almacenamiento adecuado que minimice la degradación de los compuestos bioactivos y garantice la consistencia de los resultados.

Agradecimientos

A la Dirección de Investigación, Ciencia y Tecnología de la Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca, por el apoyo económico brindado durante las gestiones 2020 y 2022 para el desarrollo de esta investigación. Asimismo, agradecemos a las autoridades de la Facultad de Ciencias Químico-Farmacéuticas y Bioquímicas. Nuestro agradecimiento también al equipo de la Fundación PASOS (Antonio Aramayo, Edith Martínez y Armando Delgado Fernández) por su colaboración y apertura para llevar a cabo trabajos con las comunidades beneficiarias dentro de los proyectos de meliponicultura que desarrollan.

REFERENCIAS

- ADEPARA (2021) *Reglamento técnico de identidad e qualidade do mel de abelhas nativas sem ferrao (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) no Estado do Pará, Diário Oficial do Pará*. Brasil
- ADEPARÁ (2021) *Diário Oficial do Pará Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel de abelhas nativas sem ferrao (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) no Estado do Pará*. República Federativa do Brasil - Estado do Pará, Estado do Pará, Brasil, 50–52pp.
- Adler, M., Escóbar-Márquez, L., Solis-Soto, M.T. & Pinto, C.F. (2023) Stingless bees: uses and management by meliponiculturist women in the Chaco region of Bolivia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 19, 1–15.
- Adler, M., Zambrana-Camacho, G., Flores-Prado, L., Urquizo, O.N., Collao-Alvarado, K. & Pinto, C.F. (2024) Pollen composition and physicochemical properties of honey produced by three stingless bees species from a mesotropical subhumid region in Bolivia. *Arthropod-Plant Interactions* 18, 1013–1032.
- Berretta, A.A., Silveira, M.A.D., Córdor Capcha, J.M. & De Jong, D. (2020) Propolis and its potential against SARS-CoV-2 infection mechanisms and COVID-19 disease: Running title: Propolis against SARS-CoV-2 infection and COVID-19. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 131.
- Braghini, F., Biluca, F.C., Gonzaga, L. V., Vitali, L., Costa, A.C.O. & Fett, R. (2021) Effect thermal processing in the honey of *Tetragonisca angustula*: profile physicochemical, individual phenolic compounds and antioxidant capacity. *Journal of Apicultural Research* 60, 290–296.
- Cárdenas, C.F., Villat, F., Laporte, G., Noia, M. & Mestorino, N. (2008) Características microbiológicas de la miel: revisión bibliográfica. *Veterinaria Cuyana* 3, 29–34.
- CLSI (2020) 58 *Journal of Clinical Microbiology Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 30th ed. M. P. Weinstein, J. S. Lewis, A. M. Bobenchik, S. Campeau, S. K. Cullen, M. F. Galas, H. Gold, R. M. Humphries, T. J. Kirn, B. Limbago, A. J. Mathers, T. Mazzulli, M. Satlin, A. N. Schuetz, P. J. Simner, and P. D. Tamma (Eds). CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, USA.
- CONAL (2019a) *RESFC*. Secretaría de Regulación y Gestión Sanitaria y Secretaría de Alimentos y Bioeconomía, Argentina
- CONAL, C.N.D.A. (2019b) *Resolución Conjunta 17/2019*. Secretaría de Regulación y Gestión Sanitaria y Secretaría de Alimentos y Bioeconomía, Argentina, 1–8pp.
- D’Alvise, P., Böhme, F., Codrea, M.C., Seitz, A., Nahnsen, S., Binzer, M., Rosenkranz, P. & Hasselmann, M. (2018) The impact of winter feed type on intestinal microbiota and parasites in honey bees. *Apidologie* 49, 252–264.
- Dardón, M.J., Maldonado-Aguilera, C. & Enríquez, E. (2012) The Pot-Honey of Guatemalan Bees. In: P. Vit, S. R. Pedro, and D. Roubik (Eds), *Pot-Honey: A legacy of stingless bees*. Springer International Publishing, New York, pp. 395–408.
- Delgado, A. & Martínez, E. (2021) *Guía práctica para el manejo de abejas nativas sin aguijón*. Fundación PASOS -Cooperación Alemana, Sucre, Bolivia.
- DeMera, J.H. & Angert, E.R. (2007) Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phytogeographic regions of Costa Rica. *Apidologie* 38, 67–76.
- FAO-OMS (2000) Comisión del Codex Alimentarius *Codex para la miel*. Comisión del codex alimentarius, Roma, Italia, 1–38pp.
- Ferrufino, U. & Vit, P. (2013) Pot-Honey of Six Meliponines from Amboró National Park, Bolivia. In: P. Vit, S. R. M. Pedro, and D. Roubik (Eds), *Pot-Honey: A legacy of stingless bees*. Springer New York, New York, NY, pp. 409–416.
- Furi, L., Ciusa, M.L., Knight, D., Di Lorenzo, V., Tocci, N., Cirasol, D., Aragonés, L., Coelho, J.R.,

- Freitas, A.T., Marchi, E., Moce, L., Visa, P., Northwood, J.B., Viti, C., Borghi, E., Orefici, G., Morrissey, I. & Oggioni, M.R. (2013) Evaluation of reduced susceptibility to quaternary ammonium compounds and bisbiguanides in clinical isolates and laboratory-generated mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57, 3488–3497.
- Gonçalves, A.L., Filho, A.A. & Menezes, H. (2005) Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa Sem Ferrão *Nannotrigona Testaceicornis* (Hymenoptera : Apidae , Meliponini). *Arquivos do Instituto Biológico* 72, 455–459.
- Grajales, J., Vandame, R., Hernández, A., López, A. & Guzmán, M. (2018) Propiedades fisicoquímicas y antibacterianas de mieles de abejas sin aguijón del Sur de Chiapas, México. *Ibciencias* 1, 1–7.
- Hrnčir, M., Jarau, S. & Barth, F.G. (2016) Stingless bees (Meliponini): senses and behavior. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 202, 597–601.
- IBNORCA (2011) Normas Bolivianas.
- INEN (2016) Instituto Ecuatoriano de Normalización *Norma técnica ecuatoriana*. 1–11pp.
- Kenji Nishio, E., Carolina Bodnar, G., Regina Eches Perugini, M., Cornélio Andrei, C., Aparecido Proni, E., Katsuko Takayama Kobayashi, R. & Nakazato, G. (2016) Antibacterial activity of honey from stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 and *S. postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2016.1162985> 54, 452–460.
- Lagos Burbano, T.C., Caetano, C.M., Vallejo, F.A., Muñoz, J.E., Criollo Escobar, H. & Olaya, C.A. (2005) Caracterización palinológica y viabilidad polínica de *Physalis peruviana* L. y *Physalis philadelphica* L. = *Physalis peruviana* L. and *Physalis philadelphica* Lam. palynological characterization and pollen viability [online]. *Agronomía Colombiana*, 23(1):55-61.
- Lagos, H. (2020) Efecto de la pasteurización en miel de abeja (*Apis mellifera*) y miel de abeja melipona (*Tetragonisca angustula*). , 25.
- Lima, C.O., Dias, E.R., Reis, I.M.A., Carneiro, K.O., Pinheiro, A.M., Nascimento, A.S., Silva, S.M.P.C., Carvalho, C.A.L., Mendonça, A.V.R., Vieira, I.J.C., Braz Filho, R. & Branco, A. (2024) Ferulic acid as major antioxidant phenolic compound of the *Tetragonisca angustula* honey collected in Vera Cruz-Itaparica Island, Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 84, 1–10.
- Makarova, O., Johnston, P., Walther, B., Rolff, J. & Roesler, U. (2017) Complete Genome Sequence of the Disinfectant Susceptibility Testing Reference Strain *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538. *Genome Announc* 5:e00293–1, 4–5.
- Martínez, R.A., Schvezov, N., Brumovsky, L.A. & Román, A.B.P. (2018) Influence of temperature and packaging type on quality parameters and antimicrobial properties during Yateí honey storage. *Food Science and Technology (Brazil)* 38, 196–202.
- Martínez, T. & Cuéllar, R.L. (2004) Manejo de abejas nativas señorita (*Trigona tetragonisca angustula*) y abeja corta pelo (*Escaptutrigona posica*) en tres comunidades de Isoso. In: *MEMORIAS: VII Congreso Internacional sobre Manejo de Fauna Silvestre en la Amazonía y América Latina*. Wildlife Conservation Society, Ilheus, Brasil, pp. 557–561.
- Michener, C.D. (2013) The meliponini. *Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees* 9781461449607, 3–17.
- Miorin, P.L., Levy, N.C., Custodio, A.R., Bretz, W.A. & Marcucci, M.C. (2003) Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology* 95, 913–920.
- MP, M.P. (2020) Success as sweet as honey: Women’s organizations in the El Chaco province

- of Bolivia find success harvesting honey from stingless bees. *Mountain Partnership*. Available from: <https://mountainpartnership.exposure.co/success-as-sweet-as-honey> (November 26, 2024).
- Navarro, G. (2002) Provincia Biogeográfica Boliviano-Tucumano. In: G. Navarro and M. Maldonado (Eds), *Geografía Ecológica de Bolivia: Vegetación y Ambientes Acuáticos*. Editorial Centro de Ecología Simón I. Patiño, Departamento de Difusión., Cochabamba, Bolivia, pp. 350–451.
- Nishio, E.K., Ribeiro, J.M., Oliveira, A.G., Andrade, C.G.T.J., Proni, E.A., Kobayashi, R.K.T. & Nakazato, G. (2016) Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807. *Scientific Reports* 2016 6:1 6, 1–8.
- PASOS (2015) Antecedentes. *Fundación Participación y Sostenibilidad*. Available from: http://pasosbolivia.org/index.php?option=com_content&view=section&layout=blog&id=4&Itemid=53 (July 12, 2015).
- Pineda, M. & Isaías, D. (2005) Physical-chemistry and microbiological characterization of honey bee of five departments of Honduras.
- Popova, M., Bankova, V., Bogdanov, S., Tsvetkova, I., Naydenski, C., Marcazzan, G.L. & Sabatini, A.-G. (2007) Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin *. 38, 306–311.
- Powell, J.E., Martinson, V.G., Urban-Mead, K. & Moran, N.A. (2014) Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 7378–7387.
- Pucciarelli, A.B., Schapovaloff, M.E., Kummritz, S., Seňuk, I.A., Brumovsky, L.A. & Dallagnol, A.M. (2014) Microbiological and physicochemical analysis of yateí (*Tetragonisca angustula*) honey for assessing quality standards and commercialization. *Revista Argentina de Microbiología* 46, 325–332.
- Ramírez-Miranda, I., Moguel-Ordóñez, Y., Acevedo-Fernández, J.J. & Betancur-Ancona, D. (2023) Calidad microbiológica y actividad antibacteriana de miel producida por *Melipona beecheii* en Yucatán, México. *Revista MVZ Cordoba* 28.
- Salatino, A., Fernandes-Silva, C.C., Righi, A.A. & Salatino, M.L.F. (2011) Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Product Reports* 28, 925–936.
- SERNAP (2015) Artículos Nacional y Área Natural de Manejo Integrado Serranía del Iñao. 2. de Sousa Silveira, Z., Silva Macêdo, N., de Menezes Dantas, D., Vieira Brito, S., Silva dos Santos, H., Regis de Sousa Gomes, R.V., Douglas Melo Coutinho, H., Bezerra da Cunha, F.A. & Vanusa da Silva, M. (2024) Chemical Profile and Biological Potential of *Scaptotrigona* Bee Products (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): An Review. *Chemistry & Biodiversity* 21, e202301962.
- Tejada, R.B. (2006) *Experiencias en la crianza de abejas nativas en dos comunidades Tacanas*. Wildlife Conservación Society, Murillo, Bolivia.
- Torres, A.R., Sandjo, L.P., Friedemann, M.T., Tomazzoli, M.M., Maraschin, M., Mello, C.F. & Santos, A.R.S. (2018) Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 51, 1–10.
- TRF, T.R.F. (2018) R: The R Project for Statistical Computing. *R: The R Project for Statistical Computing*. Available from: <https://www.r-project.org/> (March 16, 2023).
- Zamora, L.G., Arias, M.L., Aguilar, I. & Umañ, E. (2012) Costa Rican Pot-Honey: Its Medicinal Use and Antibacterial Effect. In: P. Vit, S. R. Pedro, and D. Roubik (Eds), *Pot-honey: a legacy of stingless bees*. Springer Science & Business Media, New York, pp. 507–512.