



ARTICULO ORIGINAL

Formulación y estudio de estabilidad de cuatro cremas elaboradas con productos apícolas Formulation and stability study of four creams made with bee products

Teresa Giral Rivera, Dámarys Suárez Gómez, Gisela Valdés González, Rosalina García Nenínger

¹ Centro de Investigaciones Apícolas (CIAPI), Carretera de El Cano a El Chico, Km 0, Arroyo Arenas, La Lisa, La Habana, Cuba

*apiproduc@ciapi.minag.cu



Palabras clave

Cremas cosméticas
Propóleos
Miel
Veneno de abejas

Keywords

Cosmetic creams
Propolis
Honey
Bee venom

Editor: Daylen Guanche,
CIAPI, Cuba

Recibido Febrero, 19, 2017

Aceptado Febrero 27, 2017

Copyright:© This work by
Giral et al. is licensed under
[CC BY-NC-ND 4.0.](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Como citar este artículo:

Giral, T., Suárez, D., Valdés,
G., García R. (2019). Formu-
lación y estudio de estabili-
dad de cuatro cremas elabo-
radas con productos apícolas
" Apiciencia. 21 (1)

Utilizar productos cosméticos naturales es muy saludable para la piel. Además, es una forma de no dañar el medio ambiente porque se tiene la certeza de que el artículo ha sido elaborado, en su gran mayoría, con ingredientes naturales y siguiendo sistemas de producción respetuosos con el entorno. El presente trabajo tuvo como objetivo formular cuatro cremas utilizando propóleos, miel y veneno de abejas y realizar el estudio de caducidad de las mismas para determinar su vida útil. El estudio demostró la estabilidad de estos productos desde el punto de vista físico-químico, microbiológico y sensorial, donde los parámetros analizados se mantienen estables en el tiempo. La vida útil del producto quedó establecida en dos años

Using natural cosmetic products is very healthy for the skin. In addition, it is a way to avoid damage to the environment because you can have the certainty that the article has been prepared, mostly, with natural ingredients and following production systems respectful of environment. The objective of this work was to formulate four creams using propolis, honey and bee venom while the expiration study was carry out to determine their shelf life. The study demonstrated the stability of these products from a physical-chemical, microbiological and sensory point of view, where the parameters analyzed remained stable in time. Their shelf life was established in two years.

Introducción

La búsqueda de la belleza es tendencia natural del ser humano. Perseguida desde la más remota antigüedad, en un intento de modificar el aspecto y obtener los beneficios de diversa índole que esta reporta, ha hecho del uso de cosméticos una seña de identidad característica del hombre, siguiendo muy diferentes cánones a lo largo de la historia, atravesando las diferentes épocas con altibajos en su esplendor. Períodos de desarrollo cultural y de libertad individual han estado marcados por una práctica extendida de adorno personal; teniendo como contraste, tiempos oscurantistas en los que incluso el necesario aseo diario llegó a desaparecer de escena por ser considerado bien antihigiénico (por abrir los poros a los miasmas de la peste) bien pecaminoso o inmoral (por ser frecuente en casas de lenocinio). Siempre que se escarba en el pasado, los cosméticos aparecen como signo de civilización.

Se entiende por producto cosmético: Toda sustancia o preparado destinado a ser puesto en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, y/o corregir los olores corporales, y/o protegerlos o mantenerlos en buen estado.

La cosmética se sustenta en dos premisas fundamentales: inocuidad y eficacia. La inocuidad está controlada estrictamente a nivel sanitario mediante la correspondiente legislación. No se admite ningún efecto terapéutico y se excluye sistemáticamente el balance beneficio/riesgo por ser propio del medicamento. La eficacia de un producto cosmético se define como el grado de adecuación entre las propiedades reales del producto y las necesidades para las que ha sido creado (https://www2.uned.es/experto-cosmetica-dermofarmacia/parcial_modulo1.pdf). Hasta este momento el hombre ha usado los recursos naturales para el cuidado de la piel y su aspecto de forma empírica, basándose en usos tradicionales y conocimientos etnobotánicos. Desde hace solo poco tiempo se ha instalado el interés por el buen estado y salud de la piel en sectores mayoritarios de la sociedad, lo que ha demandado extractos vegetales selectivos y eficaces (Aburjai y Natsheh, 2003). La piel es la frontera que separa nuestro cuerpo del resto de las cosas. Su elevada inervación la convierte en un órgano sensorial en el que se reflejan los sentimientos, las emociones y el estado de salud. El envejecimiento se define como acúmulo de daños moleculares con el tiempo producidos por las especies reactivas de oxígeno ERO o ROS en inglés (iones, radicales libres y peróxidos). El envejecimiento de la piel «se ve» y tiene como consecuencia

una importancia social, que no tiene el envejecimiento de cualquier órgano interno. Por tanto, la preocupación por el envejecimiento cutáneo es diametralmente distinta a la que genera el envejecimiento general del organismo (Carreras, 2004). Existe un envejecimiento natural o también llamado cronológico, se da con el paso del tiempo y es producto del propio estrés oxidativo celular del organismo (González, Fernández-Lorente y Gilaberte-Calzada; 2008). El envejecimiento acelerado está provocado por diversos factores ambientales (radiación UV, campos electromagnéticos, productos químicos, climatología). En ambos casos se producen las ERO o ROS que dañan los telómeros de ADN, enzimas y membranas celulares. Estas y otras consideraciones son fundamentales para entender cuál es el presente y el futuro de los productos para la piel y belleza. Ya no basta con tener buen aspecto, sino retrasar el envejecimiento y evitar la aparición de enfermedades. La industria química y farmacéutica es consciente y por ello está sometida a presión. De hecho, en los últimos años se ha acuñado un nuevo vocablo: Cosmecéutico cosmético con acción terapéutica), que resulta de la intersección de farmacia y cosmética (Pieroni y col., 2004). Paralelamente se establece la integración interdisciplinar de la física, química y biología, por lo que es posible estudiar con más profundidad (Jadoon y col., 2015) y en algunos casos redescubrir las propiedades de las plantas.

Hace ya mucho tiempo que la cosmética dejó de ser un mundo de promesas e ilusión para convertirse en una ciencia estrechamente ligada a la investigación, la innovación y los resultados convincentes. Las marcas cosméticas nos sorprenden, casi a diario, con fórmulas que ofrecen soluciones para todo tipo de pieles y problemas, con propuestas para todos los presupuestos.

La cosmética del siglo XXI no se conforma con hidratar y proteger la piel. Se habla de cremas regeneradoras, antiedad, bioestimulantes, oxigenantes, que afinan la piel, rellenan las arrugas e incluso de «cremas milagro» capaces de borrar las huellas del paso del tiempo. En un mercado repleto de productos, para un público cada vez más informado y exigente, se hace necesario que el farmacéutico conozca las propiedades de los nuevos cosméticos y los activos que las sustentan. (<https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13065404>). La miel se usa en tratamientos para la belleza ya que es un humectante natural, tiene un poder para atraer y retener la humedad en la piel. Además de beneficios nutricionales que contiene por sus vitaminas y minerales, la miel de abejas ofrece muchas ventajas para el cuidado y salud de uno de los órganos más importantes del cuerpo: la piel. Es una herramienta infalible en el cuidado de la salud y la belleza dada sus magníficas cualidades medicinales y cosméticas. La miel de abejas

favorece la restauración, limpieza y nutrición de la piel; al incluirla en la dieta diaria proporciona las vitaminas, minerales y aminoácidos necesarios para una piel limpia, fresca y radiante. Sus propiedades cicatrizantes y humectantes la transforman en el ingrediente básico de jabones, cremas, ungüentos, mascarillas rejuvenecedoras y demás productos de belleza usados para limpiar e hidratar el cutis. (Jiménez, 2010). De la apicultura no sólo se obtiene la miel como producto mayoritario; también se obtiene propóleo, la jalea real, la cera, veneno de abejas y el polen que en países como Estados Unidos, Europa y Asia tienen una elevada demanda en la industria farmacéutica y cosmética debido a sus propiedades medicinales.

Teniendo en cuenta los hábitos de alimentación como un "alimento sano y natural" además de la miel, el propóleo ha incrementado la demanda en el mercado debido a sus propiedades antibacterianas, fungicidas, antivirales, anestésicas, antiulcerosas, inmunoestimulantes, hipotensiva, citostática, antioxidantes, fitoinhibidoras y anticariogénica (Chaillou, 2004). Es por lo tanto una materia prima valiosa para la industria farmacéutica, de cosméticos y de alimentos. La composición química del propóleo es variable y compleja, depende de la flora, y el clima del lugar de asentamiento de la colmena, motivo por el cual ha sido determinada con aproximación. Al propóleo se le atribuyen diferentes propiedades cosméticas entre las que destaca acción antiirritante, antipruriginosa y antimicrobiana, lo que le permite ser vehiculado en una forma cosmética (Vázquez, 2010).

El propóleo por su pronunciada actividad antioxidante, es una materia prima promisoría de acción tópica. Dentro de las otras propiedades del propóleo destacan por ejemplo su actividad cicatrizante, fotoprotectora y antibacteriana (De Oliveira, 2007). A partir de este producto se han elaborado diferentes formas farmacéuticas debido a sus propiedades regeneradoras de tejidos, antioxidantes y antimicrobianas. El veneno de abejas es una mezcla relativamente compleja y sus efectos se deben a una mezcla de proteínas, principalmente al polipéptido citotóxico melitina y a la apamina. Tiene propiedades antiinflamatorias, analgésicas y es un estimulante de la circulación sanguínea (Ayora y col., 2016). Cada vez hay más productos cosméticos que incluyen al veneno de abejas. Según unos estudios de la profesora Karina Reiss, del departamento de dermatología de la universidad Christian-Albrecht (Almenia), el veneno de abejas es capaz de estimular la producción de colágeno en la piel y de mantener su elasticidad. Por este motivo en los últimos años se han lanzado al mercado diferentes productos con los que se consiguen resultados espectaculares. La apitoxina mejora la firmeza de la piel y disminuye las arrugas de expresión.

El objetivo del presente estudio fue formular cuatro cremas utilizando propóleo, miel y veneno de abejas y realizar el estudio de caducidad de las mismas para determinar su vida útil.

Gilliam y Perst, 1978; Gilliam y Valentine, 1976).

Además, existe la posibilidad de contaminación de la miel a partir de hongos del tipo *Acosphaera apis* (Orden Acosphaerales) y *Acosphaera major* (Modesto et al; 2015). Adicionalmente, se ha reportado la presencia de *Bettysa alvei* o moho del polen, el cual se encuentra en la miel en forma de esporas.

Microorganismos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y Clostridiaceae como *Salmonella* y *Clostridium* Sulfioreductores, respectivamente, también han sido detectados en la miel (Collins, C.H. y col., 1999). Además han sido encontradas en la miel, esporas de *C. botulinum* tipo G, aunque en bajos niveles, (Monetto, A y col., 1999). La presencia de esporas de este clostridio es en especial peligrosa para bebés y niños de corta edad (Centorbi, 1999), siendo causante del Botulismo infantil.

También se han detectado otros microorganismos patógenos para el hombre como *Staphylococcus aureus* y *B. cereus*. La legislación exige la ausencia total de microorganismos patógenos o toxinas patógenas, así como la ausencia de Enterobacteriaceae, *Escherichia coli* y *Salmonella* y *Shigella*.

Identificación de microorganismos en la miel

Los métodos convencionales de detección de microorganismos requieren que la bacteria a detectar forme una colonia en un medio de cultivo, lo cual es en sí mismo una de las limitantes de estos métodos. La detección de microorganismos mediante cultivo no implica una gran inversión económica ni gasto en material excesivo. Sin embargo, necesita mano de obra suficiente para la preparación de los medios de cultivo apropiados y el registro de resultados. De modo que se requieren varios días antes de la obtención del resultado (Rodríguez et al, 2009).

Reacción en cadena de la polimerasa

Los avances en la instrumentación e implementación de los descubrimientos de la bioquímica y la biología molecular permiten utilizar la información genética de los microorganismos como herramienta de identificación y cuantificación (Rojas et al, 2006). En la actualidad se han realizado numerosos estudios donde se emplea la PCR como alterna-

tiva para la identificación de microorganismos en la miel (Tabla 2) (Rossi et al , 2018, López et al, 2019, Rojas et al 2006).

Las herramientas moleculares basadas en PCR constituyen uno de los métodos más ampliamente usados debido a su

alta especificidad, sensibilidad, y capacidad de procesamiento de grandes cantidades de muestras. La PCR es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica la secuencia blanco de ADN durante varios ciclos (Tamaya et al, 2013). En esta metodología un factor clave es la correcta selec-

Tabla 2. Identificación de microorganismos en la miel mediante métodos moleculares.

Microorganismos	Métodos empleados	Referencia
Clostridium botulinum Staphylococcus aureus Staphylococcus epidermidis Pseudomonas aeruginosa Escherichia coli Salmonella enteritidis Listeria monocytogenes Clostridium botulinum	PCR	Zamora et al, 2011
género Bacillus	PCR	Alvarez 2012
Paenibacillus larvae	qPCR	Franca et al, 2018
Bacillus Brevibacillus, Lysinibacillus, Rummeliibacillus	PCR	López et al ,2019
Coliformes totales	PCR	Ramos 2019
Clostridium botulinum	PCR-ELISA, PCR	Hielm et al, 1998; Fach et al, 2002 y Nevás et al, 2002
Bacillus Brevibacillus, Paenibacillus larvae Lysinibacillus, Rummeliibacillus	PCR-RFLP	López et al, 2018
Paenibacillus larvae Melissococcus plutonis Ascosphaera apis	PCR multiplex	Maldonado et al, 2018
Coliformes totales	PCR	Ramos et al, 2019
Paenibacillus larvae	PCR	Silva et al, 2017

ción de la secuencia blanco a amplificar. Esta secuencia debe permitir la identificación del microorganismo de interés de forma específica, independientemente de la presencia de otras fuentes de ADN (microorganismos concomitantes o la muestra misma). Las diferencias en la secuencia de genes ortólogos pueden servir como herramienta útil en la tipificación de diferentes cepas y serotipos de una misma especie o de especies cercanas filogenéticamente (Rojas et al, 2006). La PCR muestra parámetros de sensibilidad y especificidad analíticas válidos para la detección de microorganismos en la miel, (López et al ,2019).

Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo

Real y PCR Multiplex

La Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR), como su nombre lo indica permite registrar o detectar la secuencia de ADN amplificada en tiempo real mediante el empleo de una molécula fluorescente. De modo que no se requiere la evaluación de los productos mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, a diferencia de la PCR convencional. Entre las moléculas fluorescentes más empleadas se encuentran el SYBR Green y las sondas de hidrólisis (TaqMan) (Leal 2011). Una de las ventajas más grandes que tiene esta variación de la PCR es la realización en condiciones libres de contaminación y poco o nada manipulación del operario en el caso de ser

automatizado el ensayo (Kubista, 2006). Además, en comparación con la PCR convencional esta variante genera resultados que pueden ser cuantificados siempre que la calidad del ADN amplificado sea el adecuado. Adicionalmente, aporta mayor sensibilidad y seguridad para el operario al evitar el uso de reactivos cancerígenos como el bromuro de etidio (Gómez et al, 2011) (Butler, 2007). La qPCR según la norma ISO 16140 del 2003 y la Asociación Francesa de Normalización (AFNOR) es un método de cribado alternativo para la evaluación de patógenos en alimentos (Huertas et al, 2019).

La PCR multiplex es una técnica que permite la detección simultánea de diferentes fragmentos de ADN en una misma mezcla de reacción. De modo que esta técnica permite identificar la presencia de diferentes microorganismos en una misma muestra.

Entre los factores que limitan la aplicación de la PCR en la identificación de microorganismos patógenos en muestras de alimentos destaca la presencia de sustancias que pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre la reacción en muestras de alimentos, clínicas y ambientales ha sido reportada por varios autores (Fach et al, 2002; Nevas et al, 2002; Ymamada et al, 1999; Lindstrom et al; 2001). Entre los compuestos identificados que ejercen un efecto negativo sobre la PCR se encuentran los polisacáridos, las grasas, proteínas e iones metálicos presentes en las matrices alimenticias (Rossen et al, 1992). Además, algunas sales usadas comúnmente en los protocolos de extracción de ácidos nucleicos también pueden inhibir la PCR (Al-Soud et al, 2001).

Debido a la alta concentración de carbohidratos (al menos 80% de azúcar) (Pineda et al, 2019), la miel es una matriz muy compleja y el aislamiento del ADN no es una tarea fácil, los azúcares copurificados con ADN objetivo podrían inhibir la polimerasa utilizada en la amplificación por PCR (Olivieri et al, 2012). Por lo que todo protocolo debe optimizarse para garantizar una cantidad suficiente de ADN libre de sustancias inhibitorias de PCR.

Conclusiones

La disminución de la contaminación e infección por patógenos en la miel de abeja es una de las prioridades en la comercialización a nivel mundial. El control microbiológico estricto en la cadena de producción de alimentos y disponer de pruebas confiables, rápidas e internacionalmente aceptadas para la determinación de microorganismos patógenos, no patógenos o que disminuyen la calidad de la misma, dañando su valor a nivel de mercado es imprescindible. Se ha demostrado a lo largo de los años que la amplificación del ADN mediante la PCR y todas sus variantes, es

una herramienta poderosa en el diagnóstico microbiológico permitiendo la identificación de numerosos microorganismos propios y contaminantes de la miel.

Sin embargo, su empleo en la industria alimenticia es limitado. Su uso aún necesita mayor investigación y desarrollo de metodologías para alimentos específicos.

Referencias Bibliográficas

1. A.C. López and A.M. Alippi, Feasibility of using RFLP of PCR amplified 16S rRNA gene(s) for rapid differentiation of isolates of aerobic spore-forming bacteria from honey, *Journal of Microbiological Methods*, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105690>
2. A.C. López and A.M. Alippi, Feasibility of using RFLP of PCR amplified 16S rRNA gene(s) for rapid differentiation of isolates of aerobic spore-forming bacteria from honey, *Journal of Microbiological Methods*, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105690>
3. Al-Soud W, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 485-493.
4. Álvarez, K. A. V. (2012). Caracterización de cepas de *Bacillus* aisladas de muestras de miel y de colmena mediante la secuenciación del gen Ribosomal 16S (Doctoral dissertation, Universidad Austral de Chile). Arcos Farfán, Lisseth Juliana, Análisis Físico Químico De La Miel De Abeja Clase II. Machala : Universidad Técnica De Machala, 2016
5. Augusto, C. T. J. (2019). Efecto de tres diluciones y dos tipos de levaduras sobre los parámetros sensoriales, fisicoquímicos y microbiológicos en la elaboración de hidromiel (doctoral dissertation, universidad agraria del ecuador).
6. Autio T, Hielm S, Miettinen M, Jöberg A-M, Aarnisalo K, Björkroth J, et al. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65:150-155.
7. Barroso-Arévalo, S., Fernández-Carrión, E., Goyache, J., Mole-ro, F., Puerta, F., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2019). High load of deformed wing virus and *Varroa destructor* infestation are related to weakness of honey bee colonies in southern Spain. *Frontiers in microbiology*, 10, 1331.
8. Blackburn, C y McClure, P. Introduction. En: Blackburn, C y McClure, P. *Foodborne pathogens. Hazards, risk analysis and control*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2002. p. 3-12.
9. Bonilauri P, Bardasi L, Leonelli R, Ramini M, Luppi A, Giacometti F, et al. Detection of food hazards in foods: comparison of real time polymerase chain reaction and cultural methods. *Ital J Food Saf [Internet]*. 2016 [cited 2016 Oct 15];5(1).
10. Carlos Huertas-Caro¹, Eliana Urbano-Cáceres^{1*}, María Torres-Caycedo¹, *Molecular diagnosis: an alternative for the detec-*

- tion of pathogens in food, *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, AÑO 2019 18(3) MAYO-JUNIO ISSN 1729 - 519X
11. Centorbi, H. J., Aliendro, O. E., Demo, N. O., Dutto, R., Fernandez, R., & Puig de Centorbi, O. N. (1999). First case of infant botulism associated with honey feeding in Argentina. *Anaerobe*, 5(3-4), 181-183.
 12. Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa Rafael Antonio Rojas-Herrera, Tania González-Flores*
 13. Emma Letchera and Davida S. Smytha, *Hitchhikers in Honey: An investigation of the inhibitory mechanisms of bacteria found in honey*, 2019
 14. Espín, L., Vázquez, B., Schencke, C., Sandoval, C., & del Sol, M. (2020). Reparación de Lesiones Musculares por Incisión Quirúrgica Coadyuvada con una Formulación Basada en Miel Nativa (Ulmoplus®). Estudio Experimental en Modelo Animal de Conejo (*Oryctolagus cuniculus*). *International Journal of Morphology*, 38(2), 492-498.
 15. Evans, J. D., & Armstrong, T. N. (2006). Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *BMC ecology*, 6(1), 4.
 16. Fach P, Perelle S, Dilasser F, Grout J, Dargaignaratz C, Botella L, et al. Detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay of *Clostridium botulinum* in fish and environmental samples from a coastal area in northern France. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 5870-5876.
 17. Fach P, Perelle S, Dilasser F, Grout J, Dargaignaratz C, Botella L, et al. Detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay of *Clostridium botulinum* in fish and environmental samples from a coastal area in northern France. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 5870-5876.
 18. Franca Rossi 1,* , Carmela Amadoro 2, Addolorato Ruberto 1 and Luciano Ricchiuti 1, Evaluation of Quantitative PCR (qPCR) *Paenibacillus larvae* Targeted Assays and Definition of Optimal Conditions for Its Detection/Quantification in Honey and Hive Debris, 16 November 2018
 19. Franca Rossi 1,* , Carmela Amadoro 2, Addolorato Ruberto 1 and Luciano Ricchiuti, Evaluation of Quantitative PCR (qPCR) *Paenibacillus larvae* Targeted Assays and Definition of Optimal Conditions for Its Detection/Quantification in Honey and Hive Debris, 16 November 2018
 20. Gómez D, Lavayén S, Nario F, Piquin A, Zotta CM. Detección de microorganismos potencialmente patógenos en hogares de Mar del Plata. *Acta bioquímica clínica Latinoam*. 2011;45(3):441-5.
 21. Gómez D, Lavayén S, Nario F, Piquin A, Zotta CM. Detección de microorganismos potencialmente patógenos en hogares de Mar del Plata. *Acta bioquímica clínica Latinoam*. 2011;45(3):441-5.
 22. Grosso, G. S. (2001). Estudio analítico comparativo de las propiedades fisicoquímicas de mieles de *apis mellifera*, en algunas zonas apícolas de los departamentos de boyaca y tolíma (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).
 23. Guadalupe, R., & Viviana, E. (2019). Determinación de coliformes totales en miel de abejas en el cantón Mejía de la provincia de Pichincha, Ecuador (Bachelor's thesis, Quito: UCE).
 24. Huertas-Caro, C., Urbano-Cáceres, E., & Torres-Caycedo, M. (2019). Diagnóstico molecular una alternativa para la detección de patógenos en alimentos. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 18(3), 513-528.
 25. Leal CAG. Desenvolvimento e otimização de protocolos de PCR em tempo real para o diagnóstico de patógenos emergentes para a aquicultura nacional. [Tesis Doctoral]. Universidad Federal de Lavras; 2011. [Citado 2016 Oct 3].
 26. Lindstrom M, Keto R, Markkula A, Nevas M, Hielm S, Korkeala H. Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* Types A, B, E, and F in food and fecal material. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 5694-5699.
 27. López, A. C., & Alippi, A. M. (2019). Feasibility of using RFLP of PCR-amplified 16S rRNAs for rapid differentiation of aerobic spore-forming bacteria from honey. *Journal of Microbiological Methods*, 2019.
 28. Luis Gabriel Zamora, María Laura Arias, Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón, *Rev Biomed* 2011; 22:59-66
 29. Maldonado Yaguana, G. A. (2018). Estandarización de una PCR múltiple para la identificación de tres patógenos en abejas del Ecuador (Bachelor's thesis, Quito: Universidad de las Américas, 2018).
 30. María Alejandra Aguillón Márquez, Claudia Hernández y Ana Ruby Correa, Caracterización Microbiológica en miel de *Apis mellifera* y *Tetragonisca angustula*, 2014
 31. María Luisa Carrillo-Inungaray Rocío Crystabel López González, Brenda Alvarado Sánchez Mayra Aguilar Zárata, Comparación de los métodos fenotípico y molecular para identificación de patógenos en alimentos. 2011 Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca Universidad Autónoma de San Luis Potosí maluisa@uaslp.mx
 32. Monetto, A. M., Francavilla, A., Rondini, A., Manca, L., Siravegna, M., & Fernandez, R. (1999). A study of botulinum spores in honey. *Anaerobe*, 5(3-4), 185-186.
 33. Namini, Z. N., Mousavi, M. H., Mahmoudi, R., & Hassanzadeh, P. (2018). Hygienic quality of the honey samples produced in the Iran in comparison with international standards. *International Food Research Journal*, 25(3), 982-988.
 34. Nevas M, Hielm S, Lindström M, Horn H, Koivulehto K, Korkeala H. High prevalence of *Clostridium botulinum* types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. *Int J Food Microbiol* 2002; 72: 45-52

35. Nora Mestorino, F. Coll Cárdenas, María Cecilia Villat, Gladys Laporte, *Características microbiológicas de la miel*, 2008
36. Palomino-Camargo C, González-Muñoz Y. *Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2014;31(3):535-46.
37. Pineda Ballesteros, E., Castellanos Riveros, A., y Téllez Acuña, F. R. (2019). *Determinantes fisicoquímicos de la calidad de la miel: una revisión bibliográfica*. *Cuadernos de Desarrollo Rural*, 16(83). <https://doi.org/10.11144/Javeriana.cdr16-83.dfcm>
38. Pineda Ballesteros, E., Castellanos Riveros, A., y Téllez Acuña, F. R. (2019). *Determinantes fisicoquímicos de la calidad de la miel: una revisión bibliográfica*. *Cuadernos de Desarrollo Rural*, 16(83). <https://doi.org/10.11144/Javeriana.cdr16-83.dfcm>
39. Subramanian, H. Umesh Hebbar & N.K. Rastogi (2007) *Processing of Honey: A Review*, *International Journal of Food Properties*, 10:1, 127-143, DOI: 10.1080/10942910600981708
To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10942910600981708>
40. Ramos GG, Sánchez CAN, Gallaguer HS, Rodríguez PMA, Morales ZE, Chan RMS, *Wounds Treated with Honey*. *Clinical Cases, Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica* 2017; 15 (4)
41. Ramos Guadalupe Erika Viviana, *Determinación de coliformes totales en miel de abejas en el cantón mejía de la provincia de pichincha, ecuador 2019*
42. Rojas Herrera, Rafael Antonio; González Flores, Tania *Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa Bioquímica*, vol. 31, núm. 2, abril-junio, 2006, pp. 69-76
43. Rossen L, Norkov P, Holmstrom K, Rasmussen O. *Inhibition of PCR by components of food samples, microbiological diagnosis assays and DNA-extraction solutions*. *J Food Microbiol* 1992; 17: 37-45.
44. Rubio Zaragoza, M., Sopena Juncosa, J. J., & Carrillo Poveda, J. M. (2017). *Aplicación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento autólogo en asociación con Células Madre Mesenquimales derivadas de grasa en el tratamiento de heridas experimentales en el conejo/tesis doctoral presentada por Deborah Chicharro Alcántara; dirigida por [el] Dr. Joaquín J. Sopena Juncosa,[la] Dra. Mónica Rubio Zaragoza,[y el] Dr. José María Carrillo Poveda*.
45. Snowdon, J. A., & Cliver, D. O. (1996). *Microorganisms in honey*. *International journal of food microbiology*, 31(1-3), 1-26.
46. Suarez-Luque, S., Mato, I., Huidobro, J. F., Simal-Lozano, J., & Sancho, M. T. (2002). *Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 955(2), 207-214.
47. Tamara García López, Airam Cabrera Rodríguez, Raquel Jiménez Anero, Jesús Alberto Martín González, Ana Campos Serrano, Isabel María Rodríguez Rodríguez *La miel como método para el tratamiento de heridas*, 2018
48. Tamay de Dios L,* Ibarra C,** Velasquillo C* 2013 *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*
49. Tamay de Dios L,* Ibarra C,** Velasquillo C*, *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*, Vol. 2, Núm. Mayo-Agosto 2013 pp 70-78
50. Taormina, P. J., Niemira, B. A., & Beuchat, L. R. (2001). *Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power*. *International journal of food microbiology*, 69(3), 217-225.
51. Wen, Y., Wang, L., Jin, Y., Zhang, J., Su, L., Zhang, X., ... & Li, Y. (2017). *The microbial community dynamics during the vitex honey ripening process in the honeycomb*. *Frontiers in microbiology*, 8, 1649.
52. Yamada S, Ohashi E, Agata N, Venkateswaran K. *Cloning and nucleotide sequence analysis of gyrB of Bacillus cereus, B. thuringiensis, B. mycoides, and B. anthracis and their application to the detection of B. cereus in rice*. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 1483-1490.
53. Yépez Álvarez Bryan Renán, Mosquera Andrade Jorge Adalberto, *Determinación de la presencia o no de Bacillus cereus sensu lato en miel de abejas de apiarios del cantón Mejía de la provincia de Pichincha*. 2019
54. Zamora, L. G., & Arias, M. L. (2011). *Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón*. *Revista biomédica*, 22(2), 59-66.