



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“OZONIZACIÓN DE MIELES DE ABEJA (*Apis mellifera*) PARA ASEGURAR
AUSENCIA DE MOHOS Y LEVADURAS, PARA APLICACIONES
MEDICINALES”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: DAQUILEMA GUARACA CRISTINA ROSA

DIRECTOR: DR. GALO ALBERTO INSUASTI CASTELO

Riobamba-Ecuador

2019

©2019, Cristina Rosa Daquilema Guaraca

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho del Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación Tipo: Trabajo Experimental “OZONIZACIÓN DE MIELES DE ABEJA (*Apis mellifera*) PARA ASEGURAR AUSENCIA DE MOHOS Y LEVADURAS, PARA APLICACIONES MEDICINALES”, de responsabilidad de la señorita egresada Cristina Rosa Daquilema Guaraca, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Galo Alberto Insuasti Castelo

DIRECTOR DE TRABAJO

DE TITULACIÓN

Dra. Janneth María Gallegos Núñez

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, Cristina Rosa Daquilema Guaraca, declaro que el presente trabajo de investigación es de mi autoría y los resultados expuestos son auténticos y originales. El patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO Y MI PERSONA.

Cristina Rosa Daquilema Guaraca
150102666-8

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado principalmente a Dios, por haberme dado la vida y permitirme haber llegado a este momento tan importante de mi formación profesional, por haberme dado las fuerzas necesarias para enfrentar cada dificultad con firmeza e inteligencia y la capacidad y sabiduría necesaria para seguir adelante.

A mis padres Cesar Daquilema y María Guaraca, quienes fueron mi pilar fundamental para culminar esta etapa de mi formación, nunca me dejaron sola y siempre con sus palabras de aliento me supieron guiar por el camino del respeto y amabilidad. A ellos les debo lo que soy.

A mis hermanos que me apoyaron incondicionalmente en cada paso de mi vida, cada uno de ellos son únicos y apreciados para mí, por sus consejos que me enseñaron a salir adelante a pesar de las dificultades, a lograr algo si te lo propones, que nada en la vida es duro si te esfuerzas y das todo de ti y que estarán a mi lado en las buenas y en las malas en todo momento.

Cristina

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento infinito a Dios por haberme ayudado a culminar esta etapa de mi vida.

Agradezco a mis padres que con sus valores y amor eterno me guiaron durante todo este tiempo, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos.

A mis hermanos quienes estuvieron junto a mí en todo momento, supieron enseñarme a seguir adelante y que junto a sus ideas y locuras hemos pasado momentos inolvidables.

A mi enamorado Manuel Pinto, por ser mi apoyo y mi refugio durante toda esta etapa de mi vida, por sus consejos y su amor que me brinda día con día para alcanzar nuevas metas, tanto profesionales como personales.

Mi agradecimiento a todas las autoridades de la ESPOCH por haberme abierto las puertas de la institución y a los docentes por compartir sus conocimientos y enseñanzas a lo largo de mi preparación como profesional.

Al Doctor Galo Insuasti, por todo el tiempo y dedicación brindada durante todo el desarrollo del trabajo.

A la BQF. Yolita Buenaño, una gran persona que a pesar de conocerla por poco tiempo, me demostró que existe personas de buen carácter, amabilidad y con las ganas de ayudar al prójimo.

A mis amigas y amigos que hicieron más alegre esta etapa de mi vida, por sus consejos y ocurrencias y por estar en todo momento a pesar de todo.

Cris

TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN.....	xix
ABSTRACT.....	xx
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	4
1.1. Apicultura	4
1.2. Productos apícolas.....	4
1.2.1. Jalea real	4
1.2.2. Polen	4
1.2.3. Cera.....	5
1.3. Miel.....	5
1.3.1. Definición	5
1.3.2. Origen de la miel	5
1.3.3. Formación de la miel	6
1.4. Composición química de la miel	6
1.4.1. Sacáridos	6
1.4.2. Aminoácidos y proteínas	7
1.4.3. Enzimas	7
1.4.4. Vitaminas.....	7
1.4.5. Pigmentos	7
1.5. Composición física-química de la miel	8
1.5.1. Color	8

1.5.2.	<i>Sabor</i>	8
1.5.3.	<i>Aroma</i>	8
1.5.4.	<i>pH</i>	8
1.5.5.	<i>Actividad de agua</i>	9
1.5.6.	<i>Cristalización</i>	9
1.5.7.	<i>Viscosidad</i>	9
1.5.8.	<i>Humedad</i>	9
1.5.9.	<i>Acidez</i>	10
1.6.	Gas ozono	10
1.6.1.	<i>Definición</i>	10
1.6.2.	<i>Características del ozono</i>	10
1.7.	Formación no catalítica del ozono	11
1.8.	Dstrucción no catalítica del ozono	11
1.9.	Propiedades y usos del ozono	12
1.10.	Formas de acción del ozono	13
1.10.1.	<i>Acción germicida del ozono</i>	13
1.10.2.	<i>Mecanismo de la lisis antimicrobiana del ozono</i>	13
1.10.3.	<i>Capacidad inmunomoduladora del ozono</i>	13
1.11.	Aplicaciones del ozono	14
1.11.1.	<i>Ozonoterapia</i>	14
1.11.1.1.	<i>Mecanismo de acción de ozonoterapia</i>	14
1.11.2.	<i>Alimentos</i>	15
1.12.	Levaduras	15
1.12.1.	<i>Características generales</i>	15
1.12.2.	<i>Curva de crecimiento bacteriano</i>	16
1.12.3.	<i>Actividad de agua en las levaduras</i>	17
1.12.4.	<i>Proceso de fermentación</i>	17
1.12.5.	<i>Fermentación alcohólica</i>	17
1.12.6.	<i>Bioquímica de la reacción</i>	18

1.12.7.	<i>Limitaciones del proceso</i>	18
1.13.	Candida albicans	20
1.13.1.	<i>Taxonomía de Candida albicans</i>	20
1.13.2.	<i>Descripción y características generales</i>	20
1.13.3.	<i>Patogenicidad</i>	21
1.13.3.1.	<i>Mecanismo de patogenicidad</i>	22
1.14.	Saccharomyces cerevisiae	22
1.14.1.	<i>Taxonomía de Saccharomyces cerevisiae</i>	22
1.14.2.	<i>Descripción y características generales Saccharomyces cerevisiae</i>	23
1.14.3.	<i>Morfología de Saccharomyces cerevisiae</i>	23
1.14.4.	<i>Requerimientos nutricionales de Saccharomyces cerevisiae</i>	24
1.14.5.	<i>Composición química</i>	24
1.14.6.	<i>Metabolismo de Saccharomyces cerevisiae</i>	25
1.14.7.	<i>Aplicaciones de Saccharomyces cerevisiae</i>	26
1.14.7.1.	<i>A nivel industrial</i>	26
1.14.7.2.	<i>Alimento animal</i>	26

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	27
2.1.	Lugar de la Investigación	27
2.2.	Tipo de Investigación	27
2.3.	Ejecución metodológica.	28
2.3.1.	<i>Selección del apicultor proveedor de miel genuina</i>	28
2.3.2.	<i>Definición metodológica de la concentración no letal de miel de abeja para su contaminación experimental con levaduras</i>	28
2.3.2.1.	<i>Material biológico</i>	29
2.3.2.2.	<i>Materiales y equipos</i>	29
2.3.2.3.	<i>Procedimiento</i>	29

2.3.3.	<i>Diseño del dispositivo para la ejecución de los tratamientos de ozonización de solución salina de miel de abeja al 50% contaminada con levaduras.....</i>	32
2.3.3.1.	<i>Materiales, equipos y especificaciones.....</i>	32
2.3.3.2.	<i>Armado del dispositivo.....</i>	34
2.3.4.	<i>Ejecución de los tratamientos de ozonización de las soluciones salinas de miel de abeja al 50% no letal para las levaduras.</i>	35
2.3.4.1.	<i>Diseño del tratamiento de ozonización de soluciones salinas de miel de abeja al 50% contaminadas.</i>	35
2.3.4.2.	<i>Preparación de la solución salina de miel de abeja al 50% contaminada para los tratamientos de ozonización.....</i>	36
2.3.4.3.	<i>Ozonización de solución salina de miel al 50%.....</i>	37
2.3.5.	<i>Monitoreo del proceso de fermentación, cuantificando UPC y mediante medición de CO₂. (Definición de posible comportamiento microbiostática).....</i>	38
2.3.5.1.	<i>Análisis microbiológico de muestra ozonizada sin fermentar (T=0 h).....</i>	38
2.3.5.2.	<i>Monitorización del proceso de fermentación de la muestra ozonizada.</i>	41
2.3.5.3.	<i>Pruebas confirmatorias anexas al procedimiento de monitorización del proceso de fermentación.....</i>	42
2.3.5.4.	<i>Valoración de oxígeno molecular por degradación de ozono.</i>	42
2.3.5.5.	<i>Análisis microbiológico de muestra ozonizada fermentada (cuantificación de UPC)</i>	43
2.3.6.	<i>Análisis estadístico</i>	44
2.3.7.	<i>Socialización del mejor tratamiento de ozonización a ASOPROACH.....</i>	44

CAPÍTULO III

3.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	45
3.1.	Proceso de selección del apicultor de ASOPROACH, proveedor de miel de abeja genuina.	45
3.2.	Concentración no letal de miel de abeja para su contaminación experimental con levaduras.	45

3.3.	Dispositivo diseñado para tratamientos de ozonización de soluciones salinas de miel de abeja.	47
3.4.	Diseño y ejecución de tratamientos de ozonización.....	48
3.5.	Monitoreo de fermentación, mediante cuantificación de UPC y medición de CO₂.	49
3.5.1.	<i>Análisis microbiológico de las muestras ozonizadas no fermentadas (T=0 h). ...</i>	49
3.5.1.1.	<i>Análisis de la solución salina de miel de abeja al 50% ozonizada inoculada con Candida albicans, muestra sin fermentar (T=0 h).....</i>	49
3.5.1.2.	<i>Análisis de la solución salina de miel de abeja al 50% ozonizada y previamente contaminada con Saccharomyces cerevisiae, muestra sin fermentar (T=0 h)</i>	52
3.5.2.	<i>Proceso de fermentación (horas) de las muestras ozonizadas en Jeringuillas. ...</i>	55
3.5.2.1.	<i>Análisis del monitoreo de fermentación de la solución salina de miel de abeja al 50% contaminada con Candida albicans en jeringuillas.....</i>	55
3.5.2.2.	<i>Análisis del monitoreo de fermentación de la solución salina de miel de abeja al 50% contaminada con Saccharomyces cerevisiae en jeringuillas.</i>	58
3.5.3.	<i>Pruebas confirmatorias alternativas anexas del monitoreo de fermentación de las muestras ozonizadas en Jeringuillas.</i>	62
3.5.3.1.	<i>Valoración de oxígeno molecular por degradación de ozono.</i>	62
3.5.3.2.	<i>Análisis microbiológico para valorar el crecimiento de levaduras de las muestras ozonizadas fermentadas.</i>	64
3.5.3.3.	<i>Análisis microbiológico de la solución salina de miel de abeja al 50% contaminada con Candida albicans.....</i>	64
3.5.3.4.	<i>Análisis microbiológico de la solución salina de miel de abeja al 50% contaminada con Saccharomyces cerevisiae</i>	67
3.5.4.	<i>Socialización a ASOPROACH.....</i>	70
	CONCLUSIONES.....	71
	RECOMENDACIONES.....	72
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1-1: Solubilidad del ozono en agua.....	12
Tabla 2-1: Clasificación taxonómica de <i>Candida albicans</i>	20
Tabla 3-1: Clasificación taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
Tabla 4-1: Composición química de levaduras	25
Tabla 1-2: Especificaciones de volúmenes de inóculos y de suero fisiológico utilizado.....	30
Tabla 2-2: Preparación de cuatro concentraciones de soluciones salinas de miel de abeja. ...	30
Tabla 3-2: Especificaciones del embudo de separación utilizado en el dispositivo.....	32
Tabla 4-2: Especificaciones del material de laboratorio utilizado experimentalmente.....	33
Tabla 5-2: Características del equipo ozonizador.	33
Tabla 6-2: Preparación de 38 mL de solución salina de miel de abeja al 50%	36
Tabla 1-3: Mililitros de CO ₂ desplazados de la fermentación de cuatro concentraciones de soluciones salinas de miel de abeja para definición de la concentración no letal..	45
Tabla 2-3: Tratamientos de ozonización de soluciones salinas de miel de abeja al 50%	48
Tabla 3-3: Resultados promedios del recuento microbiológico de <i>Candida albicans</i> , después de un tratamiento de ozonización en la solución salina de miel de abeja al 50 % y muestra blanco.....	49
Tabla 4-3: Resultados promedios del recuento microbiológico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , tras un tratamiento de ozonización en solución salina de miel de abeja al 50% y muestra blanco.	53
Tabla 5-3: Tiempos promedios de fermentación de solución salina de miel de abeja al 50% contaminada con <i>Candida albicans</i> , luego de la exposición de 60 minutos al tratamiento de ozonización.....	55
Tabla 6-3: Resultados promedios del proceso de fermentación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , tras un proceso de ozonización a una solución salina de miel de abeja al 50% y muestra blanco.	59
Tabla 7-3: Resultados promedios del recuento microbiológico de <i>Candida albicans</i> (UPC/mL) de muestras fermentadas.....	65

Tabla 8-3: Resultados promedios del recuento microbiológico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (UPC/ml) de muestras fermentadas.....	67
---	----

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Páginas
Gráfico 1-3: Letalidad de cuatro concentraciones de soluciones salinas de miel de abeja al 50% sobre tres cepas de levaduras (indicador: mililitros de CO ₂ producidos).....	46
Gráfico 2-3: Efecto letal de tres concentraciones de ozono sobre el crecimiento de <i>Candida albicans</i> inoculadas en soluciones salinas de miel de abeja al 50%, sin tiempo de fermentación.....	50
Gráfico3-3: Efecto letal de tres concentraciones de ozono sobre el crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> inoculada en soluciones salinas de miel de abeja al 50% sin tiempo de fermentación.	53
Gráfico 4-3: Tiempo de fermentación de soluciones salinas de miel de abeja al 50% inoculada con <i>Candida albicans</i> , tras el proceso de ozonización.....	56
Gráfico 5-3: Curva del monitoreo del proceso de fermentación de <i>Candida albicans</i> inoculada en solución salina de miel de abeja al 50%.	57
Gráfico 6-3: Tiempo de fermentación de la solución salina de miel de abeja al 50% contaminada con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , tratadas a diferentes concentraciones de ozono .	59
Gráfico 7-3: Curva del monitoreo del proceso de fermentación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , inoculada en solución salina de miel de abeja al 50%.....	61
Gráfico 8-3: Recuento microbiológico de <i>Candida albicans</i> en muestras de soluciones salinas de miel de abeja al 50%, una vez terminado el proceso de fermentación.	65
Gráfico 9-3: Curva de monitoreo del proceso de fermentación de solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con <i>Candida albicans</i> , tratado con 59 ppm de ozono por 60 minutos.	66
Gráfico 10-3: Recuento microbiológico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en muestras de soluciones salinas de miel de abeja al 50%, una vez terminado el proceso de fermentación.	68
Gráfico 11-3: Curva de monitoreo del proceso de fermentación de solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tratado con 19 ppm de ozono por 60 minutos.....	68

ÍNDICE DE FIGURA

	Páginas
Figura 1-1: Curva de crecimiento bacteriano con cuatro fases típicas del crecimiento.....	17
Figura 2-1: Composición de la membrana plasmática de las levaduras.	21
Figura 1-2: Proceso de armado de dispositivo para tratamiento de ozonización.....	35
Figura 2-2: Preparación de diluciones decimales	40

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍA

	Páginas
Fotografía 1-3: Dispositivo para tratamientos de ozonización	47
Fotografía 2-3: Proceso de ozonización de solución salina de miel de abeja al 50%	48
Fotografía 3-3: Reducción de azul de metileno con glucosa en medio alcalino.....	62
Fotografía 4-3: Expulsión de oxígeno de las jeringuillas fermentadas.....	63
Fotografía 5-3: Coloración azul pálido, (azul de metileno oxidado), provocada por el oxígeno producto de la degradación del ozono.....	63
Fotografía 1-4: Miel de abeja genuina ASOPROACH.....	82
Fotografía 2-4: Elaboración y determinación de la concentración no letal de miel de abeja para levaduras.....	82
Fotografía 3-4: Embudo de separación de 100 mL y material de laboratorio.	83
Fotografía 4-4: Ejecución del proceso de ozonización de las soluciones salinas de miel de abejas al 50 %, previamente inoculadas con <i>Candida albicans</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> respectivamente.....	84
Fotografía5-4: Recuento microbiológico de <i>Candida albicans</i> después del proceso de ozonización, muestras sin fermentar.	85
Fotografía 6-4: Recuento microbiológico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> después del proceso de ozonización, muestras sin fermentar.	85
Fotografía 7-4: Monitoreo del proceso de fermentación de soluciones salinas de miel de abeja al 50% inoculada con <i>Candida albicans</i>	86
Fotografía 8-4: Monitoreo del proceso de fermentación de soluciones salinas de miel de abeja al 50% inoculada con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	86
Fotografía 9-4: Valoración de oxígeno molecular de las muestras en jeringuillas fermentadas inoculadas con <i>Candida albicans</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> respectivamente, mediante una prueba experimental colorimétrica.....	87
Fotografía 10-4: Análisis microbiológico de soluciones salinas de miel de abeja al 50% inoculadas con <i>Cándida albicans</i> , muestras fermentadas.	88

Fotografía 11-4:	Análisis microbiológico de soluciones salinas de miel de abeja al 50% inoculadas con <i>Candida albicans</i> , muestras fermentadas.....	89
Fotografía 12-4:	Socialización de los resultados obtenidos.....	89
Fotografía 13-4:	Aval de la Espoch.....	98
Fotografía 14-4:	Certificado de ASOPROACH.	99

ANEXOS

ANEXO A: Obtención de miel de abeja

ANEXO B: Determinación de la concentración no letal de miel de abeja para las levaduras

ANEXO C: Dispositivo para procesos de ozonización

ANEXO D: Proceso de ozonización de solución salina de miel de abeja al 50%

ANEXO E: Análisis microbiológico de *Candida albicans*, muestras sin fermentar

ANEXO F: Análisis microbiológico de *Saccharomyces cerevisiae*, muestras sin fermentar

ANEXO G: Monitoreo del proceso de fermentación de *Candida albicans*

ANEXO H: Monitoreo del proceso de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae*

ANEXO I: Valoración de oxígeno molecular por degradación de ozono

ANEXO J: Análisis microbiológico de *Candida albicans*, muestras fermentadas.

ANEXO K: Análisis microbiológico de *Saccharomyces cerevisiae*, muestras fermentadas

ANEXO L: Socialización a ASOPROACH

ANEXO M: Recuento microbiológico de la solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con *Candida albicans*, tras el proceso de ozonización, muestra sin fermentar

ANEXO N: Recuento microbiológico de la solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con *Saccharomyces cerevisiae*, tras el proceso de ozonización, muestra sin fermentar.

ANEXO O: Monitoreo del proceso de fermentación de solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con *Candida albicans*

ANEXO P: Monitoreo del proceso de fermentación de solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con *Saccharomyces cerevisiae*.

ANEXO Q: Recuento microbiológico de la solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con *Candida albicans*, muestras fermentadas

ANEXO R: Recuento microbiológico de la solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con *Saccharomyces cerevisiae*, tras el proceso de ozonización.

ANEXO S: Aval de la ESPOCH.

ANEXO T: Certificado de ASOPROACH

RESUMEN

El estudio realizado tiene como objetivo la ozonización de mieles de abeja experimentalmente contaminadas con levaduras para valorar su efecto sobre ellas, con la finalidad de utilizar los resultados en diferentes aplicaciones de tipo medicinal. En el estudio, se inoculó individualmente dos cepas de levaduras en soluciones salinas de miel de abeja al 50% (concentración establecida experimentalmente como no letal para levaduras) y se aplicó tratamientos con ozono a 99 ppm, 59 ppm y 19 ppm por 60 minutos de exposición, para la ozonización se diseñó un dispositivo “home made” usando un ozonizador BIOMAGNETIX. Se determinó el efecto del ozono sobre las levaduras a través de un primer recuento de viables y el monitoreo diario de la actividad fermentativa a través del desplazamiento del émbolo de las jeringuillas. Durante la curva de monitoreo de fermentación, se observó que existe dos periodos, uno donde existe un tiempo de bloqueo momentáneo del proceso (120 horas *Candida albicans* y 110 horas *Saccharomyces cerevisiae*), y otro posterior al tiempo de bloqueo momentáneo donde se manifiesta un reinicio fermentativo, llevándonos a realizar pruebas confirmatorias de valoración de oxígeno molecular y un segundo recuento de viables de las muestras fermentadas, definiéndose que el desplazamiento del émbolo en las jeringuillas se debe a la presión combinada del oxígeno generado por la descomposición del ozono y al CO₂ producido por las levaduras que lograron adaptarse al medio. El recuento de viables evidencia que *Candida albicans* se inhibe con 59 ppm de ozono (95,6% de inhibición) y *Saccharomyces cerevisiae* con 19 ppm (88,8% de inhibición) con una exposición de 60 minutos. Se concluyó que el ozono ejerce una actividad fungistática sobre las levaduras en las soluciones salinas de miel de abeja al 50%, actividad que puede inducir el uso de la ozonización como alternativa profiláctica en aplicaciones pertinentes.

Palabras claves: <BIOQUÍMICA>, <FARMACIA >, <OZONIZACION>, <HOME MADE (DISPOSITIVO)>, <SOLUCIÓN SALINA DE MIEL DE ABEJA>, < *Candida albicans*>, < *Saccharomyces cerevisiae*>.

ABSTRACT

The aim of this study is the ozonation of bee honey experimentally contaminated with yeasts to assess their effect on them in order to use the results in different medicinal applications. In the study, two yeast strains were inoculated individually in bee honey saline solutions to 50% (experimentally established as non-lethal concentration for yeast) and treatments with ozone were applied at 99 ppm, 59 ppm and 19 ppm for 60 minutes exposure, for ozonation, an "homemade" device was designed using a BIOMAGNETIX ozonizer. The effect of ozone on yeasts was determined through a first viable count and the daily monitoring of fermentative activity through displacement of the plunger of the syringes. During the fermentation monitoring curve, it was observed that there are two periods, one where there is a momentary blocking time of the process (120 hours *Candida albicans* and 110 hours *Saccharomyces cerevisiae*), and another subsequent the time of momentary blockage where a fermentation restart is manifested, leading us to perform confirmatory tests of molecular oxygen assessment and a second count of viable of fermented samples, defining that the displacement of the plunger in the syringes is due to the combined pressure of oxygen generated by the decomposition of ozone and the CO₂ produced for the yeasts that managed to adapt to the environment. The viable count shows that *Candida albicans* is inhibited with 59 ppm of ozone (95.6% inhibition) and *Saccharomyces cerevisiae* with 19 ppm (88.8% inhibition) with an exposure of 60 minutes. It was concluded that ozone exerts a fungistatic activity on yeasts in saline solutions of bee honey to 50%, activity that can induce the use of ozonation as a prophylactic alternative in relevant applications.

Keywords: <BIOCHEMISTRY>, <PHARMACY>, <OZONATION>, <HOMEMADE DEVICE>, <SALINE SOLUTION OF BEE HONEY>, <*Candida albicans*>, <*Saccharomyces cerevisiae*>.

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de titulación, “OZONIZACIÓN DE MIELES DE ABEJA (*Apis mellifera*) PARA ASEGURAR AUSENCIA DE MOHOS Y LEVADURAS, PARA APLICACIONES MEDICINALES”, es parte del proyecto de investigación del grupo SAGID (Seguridad Alimentaria Grupo de Investigación y Desarrollo) titulado “ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD, TRATAMIENTO TÉRMICO Y OZONIZACIÓN DE MIELES DE ABEJA DE LA ASOCIACIÓN DE PRODUCCIÓN APÍCOLA DE CHIMBORAZO (ASOPROACH) PARA EL DESARROLLO DE ELABORADOS Y POSICIONAMIENTO EN EL MERCADO” proyecto que cuenta con un acuerdo interinstitucional firmado entre el grupo de investigación SAGID, ASOPROACH y la facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

La primera mención sobre el ozono, fue realizada por el físico holandés Mak Van Marumom en 1785. Donde descubrió una sustancia gaseosa con fuerte olor característico al pasar un arco eléctrico a través del aire. En 1840 el profesor, Cristian Frederick Schonbein concernió la información de los cambios con las propiedades del oxígeno y la formación de un gas en particular, llamándolo ozono (de la palabra griega *ozein* «oloroso») (Altman, 1996a: p.42)..

El ozono es la forma elemental del oxígeno y se encuentra en la atmósfera del planeta, se origina cuando la energía ultravioleta ocasiona que los átomos de oxígeno se combinen temporalmente en grupos de tres. También se forma por descargas eléctricas dentro del oxígeno, tiene un tiempo de vida media de 45 min a 20°C (Altman, 1996b: p.42).

Es un gas de color azul pálido, se condensa en líquido azul oscuro a bajas temperaturas, circula la tierra a una altitud de entre 1500 y 3000 metros. Forma una capa protectora que absorbe la radiación ultravioleta. Sin esta capa, la vida en la tierra sería imposible (Altman, 1996c: p.42).

En la actualidad, proponer nuevas alternativas para el mejoramiento de afecciones o infecciones sin efectos adversos significativos sobre la salud, es la nueva tendencia de la medicina investigativa. El desarrollo de un elaborado que puede llegar a sobresalir muchas enfermedades conlleva a buscar y aplicar diferentes métodos que en ocasiones puede ser muy poco conocido.

A necesidad de la Asociación de Producción Apícola de Chimborazo (ASOPROACH) de imponerse en el mercado a través del desarrollo de nuevos productos o alternativas terapéuticas se desarrolló un método de ozonización sobre soluciones de miel de abeja previamente contaminada, evaluando así su efecto para posibles aplicaciones en el desarrollo de elaborados con efecto medicinal.

Hoy en día el uso del ozono ha abarcado varias áreas diferentes, siendo aplicado desde la alimentación hasta en la medicina actual. Existen estudios que demostraron que fumigar panales de miel con gas ozono a concentraciones de 215 a 430 ppm, logró matar todas las etapas de vida de la polilla de la cera mayor, indicando que la fumigación con ozono puede ayudar a reducir los niveles de pesticidas en los panales (James, 2011c: pp.355-358).

El uso de la miel no solo conlleva al ámbito alimenticio, ya que por sus propiedades antibacteriales, emolientes, desinfectantes, cicatrizantes, antiinflamatorios, se utiliza en el ámbito medicinal. Puede utilizarse diluida en una sustancia, en forma de jarabes, champú o ser utilizada directamente en forma natural. La miel de abeja, posee una microbiota propia de ella, estos microorganismos no causan daño, a menos que la miel gane humedad, llegando a alterar sus propiedades y composición química. Un factor para que la humedad pueda aumentar es falta de maduración de la miel en el panal y la mala manipulación y almacenamiento de esta, llegando a generarse una contaminación microbiana o un proceso de fermentación.(Becerra et al., 2016: pp.38-39).

En la investigación se llevó a establecer una concentración no letal de miel de abeja para las levaduras, ya que por genética, la miel posee una elevada viscosidad atribuido al contenido de azúcares y poca cantidad agua, lo cual llegaría a matar cualquier microorganismo que pudiese colonizar, lo que hacía difícil la ozonización y por ende la valoración de su efecto sobre estos microorganismo.

Este proceso de ozonización sobre soluciones de miel de abeja conlleva a establecerse como un método de desinfección eficiente y con ello el posible uso como un tratamiento profiláctico en diferentes afecciones a nivel tópico o su uso en elaborados tales como parches o cremas. Logrando así beneficiar a través de esta investigación a los apicultores de ASOPARACH y promocionando su posicionamiento en el mercado.

En la actualidad existe productos tratado con ozono como los aceite ozonizados, los cuales brinda propiedades eficaces comprobadas ante diferentes patologías, la importancia de la investigación realizada es el empleo del ozono como un agente de control fúngico sobre una solución poca realizada, como lo es la solución salina de miel de abeja.

OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN

OBJETIVO GENERAL

- Ozonizar mieles de abeja para asegurar ausencia de mohos y levaduras para aplicaciones medicinales

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar un apicultor de ASOPROACH como proveedor de miel de abeja genuina para el proceso experimental.
- Establecer la forma de contaminación experimental de la miel.
- Diseñar y ejecutar un tratamiento de ozonización, habiendo definido concentraciones de ozono y tiempo de aplicación que elimine mohos y levaduras en miel de abeja contaminada experimentalmente.
- Realizar los tratamientos estadísticos de los resultados.
- Redactar y socializar los resultados obtenidos

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Apicultura

La crianza de abeja de la especie *Apis mellifera*, posee una mayor distribución en el mundo, es una actividad que afecta directamente a toda la vida en el planeta. Esta especie originaria de África, Europa y parte de Asia, fue introducida en América (Paredes, 2015, pp.3-4). Un enjambre puede abarcar desde cinco hasta treinta mil individuos, todos los miembros y por ende cada uno de ellos dependen de los otros y no pueden existir por separado. La colonia es capaz de regular su temperatura interior, controlar la humedad de la colmena, desarrolla un comportamiento higiénico y diferenciarse unos de otros por su olor (feromonas) (Tegucigualpa, 2005, pp.4-5).

1.2. Productos apícolas

1.2.1. Jalea real

La jalea real es un producto natural de consistencia viscosa, aspecto lechoso, con un color blancuzco o blanco amarillento, de sabor ligeramente picante y olor fenólico es secretado por las abejas nodrizas, este producto es elaborado como alimento de las larvas de la colmena y como principal fuente de alimentación de la reina (Salamanca et al., 2013: p.312).

1.2.2. Polen

El polen son células reproductivas de las plantas, las abejas y demás insectos pueden transportar el estambre al estigma de otra planta, también lo hace el viento y el agua, entre otros. El polen recolectado por las abejas es un producto de la colmena fabricado con polen de flores mezclando, néctar, miel y secreciones propias de las abejas (Aloisi y Ruppel, 2014: p.297).

1.2.3. Cera

La cera es el material, que las abejas utilizan para formar sus cunas. Las abejas jóvenes lo hacen y constituye una secreción natural. Compuesta por ésteres de ácidos grasos y alcoholes, es insoluble en agua, a temperatura se solidifica y se endurece, es de color blanco, y posteriormente va cambiando y tornándose más oscura, por contenido del polen y restos de mudas de larvas en las cámaras de crías (Trillo, 2017, pp.1-2).

1.3. Miel

1.3.1. Definición

El Codex Alimentario indica que “Se entiende por miel, sustancia dulce natural producida por abejas obreras a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de plantas que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, y depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure y añeje” (FAO, 1999a: p.4).

1.3.2. Origen de la miel

El néctar, fuente principal de la que se origina la miel. Contienen azúcares como sacarosa, glucosa y fructosa en proporciones variables. Aproximadamente el 10% del peso seco del néctar es representado por muchas clases de metabolitos no azucarados, los cuales poseen diversas funciones (Roy *et al.*, 2017a: pp.4). La composición y las cantidades de estos compuestos son muy variables entre especie y tipo de nectario, otorgando a la miel su sabor y fragancia característico. Las abejas y moscas de lengua corta prefieren néctares más concentrados y ricos en hexosa (Roy *et al.*, 2017b: pp.5-6).

1.3.3. Formación de la miel

La miel se forma a partir del néctar donde, por acción de enzimas como la invertasa se transforma en glucosa, fructosa, maltosa y otros azúcares. Las abejas percoreadoras absorben con su lengua el néctar y lo guardan hasta entregarles a las obreras y por regurgitaciones sucesivas y enzimas que segregan, la cantidad de agua va disminuyendo completando así la transformación inicial (Desmoulière, 2013a: p.18).

Gracias a la deshidratación del néctar, las abejas aprovechan la pérdida de humedad para refrigerar la colmena, manteniendo constante la temperatura del nido de las crías, 36°C. En menos de cinco días, la composición de la miel pasa de 50% a poco menos de 18% de agua y 80% de azúcar (Desmoulière, 2013b: p.18).

1.4. Composición química de la miel

Por ser una sustancia muy compleja, la composición y las propiedades de la miel dependen del origen botánico del néctar o de las secreciones utilizadas por las abejas, especies de plantas, momento del día, época del año, humedad del aire, temperatura y pH ácido (entre 3.5 y 6), las cuales en ciertas etapas de fabricación afectan su composición final. De modo general se compone de carbohidratos, con un porcentaje del 80%, agua el 17% y diversos elementos (Duttman et al., 2013: pp.29-30).

1.4.1. Sacáridos

Los monosacáridos como: la glucosa con el 31 % y la fructosa con un 38% son los dos azúcares principales de la miel. Entre disacáridos se encuentra la maltosa (7,3%) y sacarosa (1,3%), a pesar de que son los azúcares más importantes de la miel, existen otros de composición más compleja los polisacáridos, que representan del 1,5 al 8%, entre ellos está, rafinosa, melezitosis, dextrantriosis y melibiosa (Desmoulière, 2013c: p.20).

1.4.2. Aminoácidos y proteínas

Estos nutrientes se presentan en baja cantidad en la miel (0,26%), incluyendo el contenido de nitrógeno. En orden ascendente de (0.041%) las peptonas, albúminas, globulinas y nucleoproteínas que provienen de la planta o secreciones de la abeja, presentan bajas cantidades de ácidos, aminos libres tales como prolina, tripsina, histidina, alanina, glicina o metionina también se hallan en la miel (Desmoulière, 2013d: p.20)

1.4.3. Enzimas

Las enzimas encontradas en la miel provienen del néctar o secreciones salivales de la abeja. Los más conocidos son glucoinvertasa, responsable de la hidrólisis de disacáridos y las amilasas alfa y beta que permiten la degradación del almidón. Una catalasa, fosfatasa, enzimas acidificantes y glucosaoxidasa convierten la glucosa en ácido glucónico y producen peróxido de hidrógeno (Desmoulière, 2013e: p.21).

1.4.4. Vitaminas

El contenido de vitaminas en la miel es poca, posee especialmente vitaminas del grupo B, tales como: tiamina B1, riboflavina B2, la piridoxina B6, el ácido pantoténico B5, ácido nicotínico B3, biotina B8 o H y ácido fólico B9, vitamina C (Desmoulière, 2013f, p.21).

1.4.5. Pigmentos

Los carotenoides y flavonoides son los principales responsables de la coloración de la miel. Los flavonoides que pertenecen a los grupos de polifenoles, poseen propiedades antioxidantes, participan en la neutralización de los radicales libres. Las mieles cuanto más oscuras son su contenido de flavonoides es mayor (Desmoulière, 2013g, p.21).

1.5. Composición física-química de la miel

1.5.1. Color

El color de la miel varía desde el blanco hasta el pardo oscuro. Las mieles con color oscuro no interfieren en su de calidad y valor nutricional, por lo contrario, este tipo de miel son más ricas en fosfatos de calcio, hierro, vitamina B1 y vitamina C (Lesser, 1987a: p.56).

1.5.2. Sabor

El sabor de la miel es acentuadamente azucarado. En general, el sabor de las mieles de colores claros es más fino que el de las mieles oscuras, donde es más intenso. Independientemente de su color, el sabor puede varias desde más o menos dulce y en ocasiones picantes y muy amargas, haciendo dificultoso su ingesta (Lesser, 1987b, p.56).

1.5.3. Aroma

El aroma depende de la planta, de donde las abejas toman el néctar. Indiscutiblemente, el aroma debe ser de origen floral y libre de aromas extraños (Lesser, 1987c, p.57).

1.5.4. pH

El pH contribuye a dar estabilidad frente a ataques microbianos y se halla muy condicionado por el contenido en sales minerales, principalmente sodio y calcio. El pH de la miel oscila entre 3.4 y 6.1 con una media de 3.9, esta variación depende de la procedencia botánica, siendo generalmente inferior o igual a 4 para mieles del tipo floral y superior a este valor para las mieles de mielada (Hernández, 2013a: p.31).

1.5.5. Actividad de agua

Es la humedad en equilibrio de un producto, esta propiedad depende de la composición, temperatura y el contenido en agua en el producto y se refleja sobre las características de calidad, como: textura, sabor, color, gusto, valor nutricional del producto y su tiempo de conservación (Arevalo, 2017, pp.12-13). La miel, por su gran contenido de azúcares se presenta como segura respecto a los peligros sanitarios, la actividad de agua de la miel oscila entre 0.490 y 0.600 aw, convirtiéndola en un alimento muy seguro frente al impulso de agentes osmotolerantes (Hernández, 2013b: p.32).

1.5.6. Cristalización

La cristalización es un proceso natural de la miel, la solidificación se da a temperaturas inferiores a 25°C, debido a su sobresaturación de azúcares. Produce la precipitación de los cristales de glucosa, separando a la miel en dos fases, una fase sólida constituida por cristales de glucosa y otra fase superior líquida con un mayor contenido en agua, lo cual favorece el crecimiento microbiano y las fermentaciones (Arcos, 2016a, p.10).

1.5.7. Viscosidad

La miel en estado líquido suele ser viscosa, esta propiedad depende de su composición química. Una baja viscosidad de la miel puede ser un indicador de la fermentación por adición de agua (Arcos, 2016b: p.10).

1.5.8. Humedad

El valor de humedad máxima de la miel es de 20%, una razón por la cual la humedad puede aumentarse, es la cosecha del producto, antes que alcance la humedad adecuada, es decir falta de maduración de la miel en el panal, también se puede atribuirse al almacenamiento de la misma en condiciones inadecuadas. Un alto porcentaje de humedad favorece el desarrollo de mohos y levaduras, lo que provoca que la miel se fermente fácilmente (SAGARPA, 2018a: p.19).

1.5.9. Acidez

Se expresa como miliequivalentes de ácido/kg: máximo 40.00. La acidez indica el grado de frescura de la miel y cuida de los ataques microbianos también lo otorga el aroma. Se le relaciona con la probabilidad de generar fermentación. La acidez aumenta cuando se usa ácido láctico o fórmico para combatir la Varroa, es por ello que este parámetro se usa como un indicador de deterioro. El sobrecalentamiento es otro factor que se refleja con un valor de acidez elevado (SAGARPA, 2018b: p.20).

1.6. Gas ozono

1.6.1. Definición

El ozono es la forma elemental de oxígeno que se encuentra en la atmósfera del planeta. Se crea en la naturaleza, cuando la energía ultravioleta ocasiona que los átomos de oxígeno se combinen temporalmente en grupos de tres. También se forma por descargas eléctricas dentro del oxígeno y alcanza concentraciones de entre 0,05 – 5 % por volumen con un tiempo de vida media de 45 min a 20°C, a menudo se crea con los rayos y truenos (Altman, 1996d: p.42).

1.6.2. Características del ozono

El ozono es un gas azul pálido que se condensa en líquido azul oscuro a bajas temperaturas. Circula la tierra a una altitud de entre 1500 y 3000 metros. Forma una capa protectora que absorbe la radiación ultravioleta. Sin esta capa, la vida en la tierra sería imposible (Altman, 1996e: p.42).

Por estudios de microondas, se ha confirmado que los átomos de oxígeno forman un ángulo de 117°, con una distancia entre O-O es de 1,28 Å. Dicho ángulo permite que los dos átomos exteriores están presionados uno con otro, pero con sus superficies dependientes. El ángulo que posee la molécula de ozono, sería la causa con que el ozono fragmenta fácilmente en O₂ y O a consecuencia de ello, las propiedades oxidantes, a lo que también contribuye su estructura electrónica molecular (Altman, 1996f: p.43).

1.7. Formación no catalítica del ozono

La reacción de formación provoca bastante calor para fijar la temperatura en la estratósfera, el aire es ligero y la concentración de moléculas es muy inferior que el oxígeno está en forma atómica, habiéndose formado por disociación del O_2 a partir de los fotones UV-C de la luz solar. La colisión final entre átomos de oxígeno conduce a la nueva formación de moléculas de O_2 , donde después de absorber más luz solar se disocia foto químicamente (Baird, 2001a: p.35).

En la estratósfera el rigor de UV- C es muy bajo, porque gran parte es filtrada por el oxígeno que se haya por encima, como el aire es más denso, la concentración de oxígeno molecular es mayor. Por estas combinaciones, la mayor parte del oxígeno estratosférico se encuentra como O_2 en lugar de oxígeno atómico (Baird, 2001b: p.36).

Como la concentración de oxígeno atómico es menor, lo más probable, es la colisión con moléculas intactas de oxígeno no disociadas, formando moléculas de ozono. Durante el día, el ozono se forma constantemente, mediante este proceso, cuya velocidad depende de la cantidad de luz UV y la concentración de átomos y moléculas de oxígeno a una determinada altitud (Baird, 2001c: p.36).

1.8. Destrucción no catalítica del ozono

Los fotones de luz en el rango del visible e incluso en partes del infrarrojo de la luz solar tienen mucha energía para arrancar un átomo de oxígeno de la molécula de O_3 . A pesar de ello, los fotones no son absorbidos por las moléculas de ozono y su disociación proporcionada por esta luz no es muy importante, pero como el ozono absorbe luz UV de longitud de onda menor de 320 nm mejor y el estado excitado evoluciona según la reacción de disociación. Por lo tanto la absorción de un fotón UV- C O UV- B por una molécula de ozono en la estratósfera da lugar a la descomposición de esta molécula y esto da cuenta de la mayor parte de la destrucción del ozono en esta región de la atmósfera (Baird, 2001d: p.37).

La destrucción catalítica del ozono ocurre en una atmósfera limpia, no en una que esta polucionada por contaminantes artificiales. En la atmósfera están presentes pequeñas cantidades de catalizadores comúnmente llamados catalizadores X, un ejemplo de ello es el monóxido de nitrógeno (NO) (Baird, 2001e: p.37).

1.9. Propiedades y usos del ozono

El ozono a concentraciones elevadas es de color azul y de fuerte olor. Su densidad es de 1,66 gramos por centímetro cúbico y sus puntos de función y ebullición se sitúa en -193 °C y -112 °C respectivamente. Es poco soluble en agua (1,09 gramos por litro a °0C). Tiene una estabilidad termodinámica muy baja. Se almacena en cilindros de acero inoxidable en disolución bastante estable de ozono. La solubilidad del ozono en el agua depende en primer lugar de la temperatura y la presión parcial del ozono en fase gas (Weber, 1979a: p.398).

Tabla 1-1: Solubilidad del ozono en agua

Temperatura (°C)	Coefficiente Bunsen ($\alpha\beta$)	Coefficiente de Henry ($K_H \times 10^{-4}$)
0	0,49	3,95
5	0,44	3,55
10	0,375	3,0
20	0,285	2,29
30	0,2	1,61
40	0,145	1,17
50	0,105	0,85

Fuente: (Weber, 1979b: p.398)

Realizado por: Cristina Daquilema

El ozono está sujeto a la descomposición en ambas fases gas y disolución. Esta descomposición se aumenta con la temperatura y es catalizada por una variedad de sustancias como: álcalis sólidos, metales, óxidos metálicos, carbón y humedad que están presentes en la fase gas. En la fase soluble, ésta composición es más rápida ya que se cataliza extremadamente por el ion hidroxilo (Weber, 1979c: p.399).

1.10. Formas de acción del ozono

Las acciones que caracterizan al ozono se basan principalmente en:

- Capacidad oxidante: potencial reducción $E_0 = + 2,07 \text{ V}$.
- Capacidad ozonolítica: acción de sus moléculas íntegras con sustancias orgánicas con formación de ozonuros (H3), los cuales son inestables (Cámbara et al., 2017a: p.66).

1.10.1. Acción germicida del ozono

Por su acción muy oxidante, ataca a varios microorganismos patógenos, apuntándose como un germicida de amplio margen de utilización. La capacidad de capturar, inactivar, destruir y eliminar agentes agresivos, lo convierte en un potente producto químico antimicrobiano, lo que realmente lo hace un elemento esencial en medicina, se utiliza en tratamientos donde la resistencia microbiana a los antibióticos no permitan la cura de su afección o haya riesgo de ocurrir sepsis crítica o generalizada en conjunto con otros tratamientos (Cámbara et al., 2017b: p.66).

1.10.2. Mecanismo de la lisis antimicrobiana del ozono

El ozono y sus metabolitos atacan a las envolturas y las membranas protectoras del microorganismo a través de la peroxidación de los fosfolípidos, lipoproteínas y polipéptidos que las constituyen y la oxidación de las moléculas de N-glucosamida de sus envolturas, impidiendo su fusión con la membrana celular. Esto provoca la ruptura de los ácidos nucleicos de los microorganismos, dando con resultado final su inactivación y destrucción (Cámbara et al., 2017c: p.66).

1.10.3. Capacidad inmunomoduladora del ozono

Estudios realizados en vítreo por han demostrado la capacidad del ozono y sus metabolitos para desarrollar una acción inmunomoduladora que le permite revitalizar las células inmunocompetentes, activación y mejorar la respuesta inmune tanto a nivel central como humoral (Cámbara et al., 2017d: p.67).

Los metabolitos de ozono activan y liberan interferones (INF- α , INF- β , INF- γ), interleucinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 y IL-10), factores de necrosis tumoral (TNF- α), estimulantes de colonias de macrófagos granulocíticos (GM-CSF) y de crecimiento (TGF- β 1). Los interferones con su actividad antiviral, previene la replicación viral y ejerce una acción inmunomoduladora, activando las células T-citotóxicas (CD8), macrófagos, eosinófilos, neutrófilos para así eliminar al microorganismo invasor (Cámara et al., 2017e: p.67). El empleo de ozono a dosis médicas han expuesto la ausencia de eventos adversos y la seguridad en la ausencia de daño o riesgo tóxico, mutagénico, cancerígeno o teratogénico, conformándose un excelente inductor de la síntesis y liberación de citocinas en el tratamiento de enfermedades y deficiencias relacionadas con el sistema inmune (Cámara et al., 2017f: p.68).

1.11. Aplicaciones del ozono

1.11.1. Ozonoterapia

La Ozonoterapia constituye una nueva práctica de la medicina biológica. El efecto más importante de la ozonoterapia es la estimulación de respuestas antioxidantes y la preservación de la integridad mitocondrial. La base de esta terapia está a nivel celular (Tezcan *et al.*, 2017: p.4). Las propiedades químicas del oxígeno y sus metabolitos se aprovechan en la terapia de O₃, su efecto radica contra los radicales libres, donde restaura y mejora los efectos defensivos naturales de las células contra los radicales y oxidantes mediante la estimulación de sistemas enzimáticos protectores básicos como: glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa y superóxido dismutasa. Confiriéndole propiedades de antienvjecimiento y antidegenerativa (Díaz et al., 2013: pp.2-3).

1.11.1.1. Mecanismo de acción de ozonoterapia

El ozono rápidamente se disuelve en el plasma y en los fluidos biológicos. Por su acción oxidante, en ellos reaccionan inmediatamente con un grupo de biomoléculas: proteínas, carbohidratos y en especial ácidos grasos poliinsaturados, y a continuación forma sus metabolitos, los cuales están constituidos por especies de oxígeno reactivo (EROS) y productos de acción lipídica (POL), que son mensajeros importantes del ozono y responsables de sus acciones biológicas y terapéuticas en el organismo (Cámara et al., 2017g: p.70).

Este proceso producido por la ozonoterapia provoca un pequeño y transitorio estrés oxidativo, que a su vez activa el sistema enzimático de antioxidantes endógenos, provocando una serie de respuestas en cascadas con la capacidad de restauradora, el equilibrio entre agentes prooxidantes y antioxidantes con un balance favorable para el organismo (Cámbara et al., 2017h: p.70).

1.11.2. Alimentos

El procesamiento de alimentos requiere un cuidado fundamental en cuestión de higiene y sanitización en sus instalaciones para asegurar la inocuidad de los productos. En 1997 la U.S. Food and Drug Administration (FDA) reconoció al ozono como GRAS (Generally Recognized As Safe) para su utilización en contacto con alimentos, pero en el 2001, esta organización aprobó el uso del ozono como aditivo de alimentos, durante su procesamiento, almacenamiento, conservación, desinfección y desodorización (Pretell et al., 2016: pp.173-174).

Los tratamientos con ozono, han demostrado ser eficaces, aumentando la vida útil de frutas y hortalizas. También es capaz de inducir el efecto hórmino en frutas frescas, promoviendo respuestas fisiológicas positivas, incluyendo la síntesis de antioxidantes, poliaminas, etileno, compuestos fenólicos y otros metabolitos secundarios. Han demostrado que el ozono induce a la formación de resveratrol y fitoalexinas, ganando una mayor resistencia de las frutas a infecciones microbianas (Ali et al., 2014: pp.20-21).

1.12. Levaduras

1.12.1. Características generales

Las levaduras conforman una gran variedad de organismos unicelulares, incluyendo especies patógenas y especies inocuas. Son células ovaladas, esférica, cilíndrica o elíptica, de mayor tamaño que las bacterias, alcanzando un diámetro máximo de entre cuatro y cinco micrómetros (Yáñez, 2017, pp.4-5). Toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero prefieren un medio ligeramente ácido con un pH entre 4,5 a 6,5 (Suárez et al., 2016a: p.21). La pared celular de las levaduras está formada por dos componentes: polisacáridos y glicoproteínas. La pared celular es capaz de

adaptarse a cambios fisiológicos o a las condiciones ambientales de su entorno. Su principal función es de garantizar la supervivencia de las células (Morales, 2007: pp.81-82).

1.12.2. Curva de crecimiento bacteriano

El crecimiento microbiano es el incremento en el número de células o masa celular por unidad de tiempo de una población de microorganismos. La curva de crecimiento de un cultivo microbiano puede subdividirse en cuatro fases: fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (Riverón et al., 2012a: p.1).

Fase de latencia, fase donde los microorganismos se adaptan al medio ambiente expuesto, sintetizan las enzimas necesarias para realizar actividades metabólicas más adelante, no hay crecimiento celular aparente. *Fase exponencial o logarítmica*, existe un crecimiento y división de las células hasta un nivel máximo posible, en función de su potencia genética y condiciones ambientales, las cuales pueden afectar su crecimiento (Riverón et al., 2012b: p.3).

Fase estacionaria, es el resultado del agotamiento de los nutrientes o de un nutriente en especial y la acumulación de sustancias tóxicas, producto del metabolismo microbiano, las cuales producen la disminución de la velocidad de crecimiento celular. *Fase de muerte*, en esta fase existe una disminución progresiva de las células viables y finalmente mueren por falta de nutrientes (Riverón et al., 2012c: p.4).



Figura 1-1: Curva de crecimiento bacteriano con cuatro fases típicas del crecimiento

Fuente: (Tortora et al., 2007: p.177)

1.12.3. Actividad de agua en las levaduras.

La mayoría de levaduras comúnmente encontradas crecen en medios con disposición de suficiente agua. Algunas levaduras son osmotolerantes y soporta una actividad de agua (a_w) del orden 0.65, valor en el que otro microorganismo no se desarrolla. El crecimiento de hongos micotoxigénicos se produce con valores de a_w cercanos a 0,78 (Orberá, 2004, pp.2-4).

1.12.4. Proceso de fermentación

Son procesos metabólicos de las levaduras y de varias bacterias que transforman compuestos químicos orgánicos, principalmente los azúcares en sustancias más simples como etanol, ácido láctico y ácido butírico. Son procesos anaeróbicos, porque su desarrollo se da en ausencia de oxígeno (Wachner, 2014a: p.4).

1.12.5. Fermentación alcohólica

Es un proceso biológico en plena ausencia de oxígeno, es llevado a cabo por organismos que utilizan hidratos de carbono, en especial azúcares (glucosa, fructosa, almidón) para obtener como

producto final etanol y dióxido de carbono en forma de gas, además de generar moléculas de ATP, que son consumidas por los microorganismos mismos (Vázquez y Dacosta, 2007a: p.251).

El etanol resultante se emplea en la producción de vinos, cerveza, sidra, biocombustibles entre otros. Estos procesos tienen como objetivo principal, proporcionar energía anaeróbica a los microorganismos en ausencia de oxígeno (Vázquez and Dacosta, 2007b: p.252). Las levaduras utilizan ciertas enzimas para generar su producto final, algunas de estas son la diastasa y la invertasa, pero la enzima responsable de convertir los hidratos de carbono en etanol y dióxido de carbono es la zimasa (Losada *et al.*, 2017: pp.111-112).

1.12.6. Bioquímica de la reacción

En la fermentación alcohólica, el primer paso es la glucólisis, donde intervienen enzimas para su completo funcionamiento. Desde el punto de vista energético, estos procesos son una reacción exotérmica, liberan energía. La liberación de dióxido de carbono genera una sensación de hervir, de ahí su nombre de fermentación (Mendoza, 2008, pp.111-112). En la glucólisis la célula llega a transformar y oxidar a la glucosa a un compuesto de tres átomos de carbono, denominado: el ácido pirúvico y logra obtener dos moléculas de ATP; aquí también se usa dos moléculas de NAD⁺ que actúan como aceptores de electrones y pasan a la forma NADH, para que puedan tener lugar las reacciones de la glucólisis que producen energía es necesario restablecer el NAD⁺ por otra reacción (Perez *et al.*, 2013: pp.452-453).

1.12.7. Limitaciones del proceso

- **Acidez del sustrato**

El pH es un factor que puede limitar los procesos de fermentación, ya que las levaduras pueden verse afectadas si el ambiente es muy alcalino o muy ácido. Por lo general las levaduras toleran un pH de 3.5 a 5.5 a nivel industrial y se emplean disoluciones tampones (Wachner, 2014b: p.4).

- **Concentración de azúcares**

La concentración de azúcares en los procesos de fermentación es muy importante ya que, una concentración excesiva o baja de carbohidratos pueden llegar a frenar la actividad bacteriana. Además la concentración elevada de azúcares puede producir fenómenos de ósmosis en la membrana celular y muerte de los microorganismos, si estos no se controlan (Wachner, 2014c: p.5).

- **Oxígeno**

Este tipo de fermentación ocurre en ausencia de oxígeno, es por ello que este proceso puede llegar a detenerse si existe un contacto de oxígeno, a pesar de que sea mínima (Granadillo *et al.*, 2014a: p.376)

- **Temperatura**

Las levaduras son microorganismo mesófilos, es decir crecen y realizan sus procesos a temperaturas cercanos a 30°C. Si existiese un aumento mayor o cercano a 55°C, las levaduras mueren (Granadillo *et al.*, 2014b: p.376)

1.13. *Candida albicans*

1.13.1. Taxonomía de *Candida albicans*

Tabla 2-1: Clasificación taxonómica de *Candida albicans*

Reino	Fungi
Filo	Deuteromiceta
Subfilo	Saccharomycotina
Clase	Saccharomycetes
Orden	Saccharomycetales
Familia	Saccharomycetaceae
Género	<i>Candida</i>
Especie	<i>Albicans</i>

Fuente: (Olea, 1995, p.6)

Realizado por: Cristina Daquilema

1.13.2. Descripción y características generales

Candida albicans y otras especies relacionadas al género *Candida*, son hongos comensales que habitan la piel, las mucosas y el tracto gastrointestinal de casi todas las personas. Está envuelta en un rol relevante en la digestión de los azúcares mediante un proceso de fermentación (Ingraham and Ingraham, 1998a: p.655). El género *Candida* incluye cerca de 154 especies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. dublinensis*, se halla con mayor frecuencia en proceso de infecciones en los seres humanos, donde *C. albicans* es el más relevante en términos de patogenicidad (Laforet, 2010, pp.5-6).

Candida albicans es un hongo diploide asexual, es decir forma de levadura. Es una saprófita de la familia de los Sacaromicetos. Microscópicamente *Candida albicans* presenta dimorfismo, una transformación de la forma ovoide de las blastosporas gemantes a hifas (Castro, 2012, pp.32-33).

Está compuesta por proteínas y polisacáridos como glucano con 50 a 60% del peso seco de la pared, quitina de 1 a 2% y manano del 30 al 40%. El más importante es el glucano ya que mantiene la estructura celular, es sintetizado por la 1,3-β-D-glucano sintetasa. La membrana citoplasmática consta de una doble capa lipídica relativamente impermeable para las moléculas hidrófilas, formada por ergosterol y otros esteroides, grandes cantidades de proteínas con una escasa proporción de carbohidratos (Ortega, 2015a: p.4)

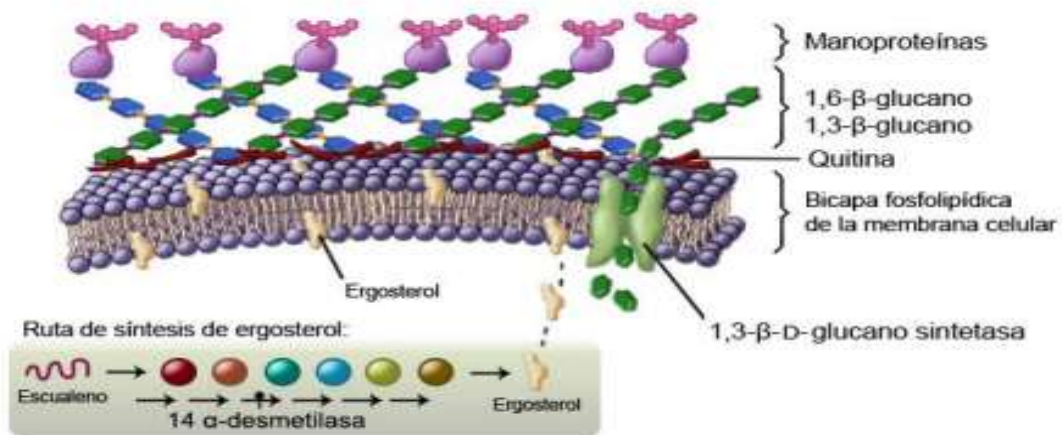


Figura 2-1: Composición de la membrana plasmática de las levaduras.

Fuente: (Ortega, 2015b: p.5)

1.13.3. Patogenicidad

Candida albicans es un verdadero patógeno oportunista. Como comensal inocuo, posee una morfología levaduriforme, pero forman hifas cuando genera una infección. Muchas alteraciones menores del equilibrio corporal tales como, el embarazo, una terapia antibiótica, los anticonceptivos orales, predispone a la persona para adquirir candidiasis, dando lugar a infecciones sintomáticas que se presenta en la superficie corporales (Ingraham and Ingraham, 1998b: p.656).

Con mayor frecuencia en niños, personas de tercera edad y aquellas con un sistema inmunodeficiente. Las zonas con mayor frecuencia de infecciones son, la vagina, cavidad bucal y la zona de la entrepierna (muguet). La temperatura óptima de crecimiento de *Candida albicans* es de 37°C, asociándose ecológicamente con seres vivos de sangre caliente (Ingraham and Ingraham, 1998c: p.656). La candidiasis es una micosis primaria o secundaria ocasionada por las levaduras del género *Candida sp.* Presenta manifestaciones clínicas que son localizadas, diseminadas o sistémicas, afectando la piel, mucosas u órganos internos. Las alteraciones histopatológicas varían desde inflamación mínima hasta supuración o reacciones granulomatosas (Quesada *et al.*, 2007: p.43).

1.13.3.1. *Mecanismo de patogenicidad*

Posee diversos factores de virulencia tales como la formación de biopelículas, la expresión de adhesinas, la transición levaduras a hifas y la liberación de enzimas hidrolíticas. El mecanismo de la adhesión a las superficies, constituye un paso previo para llegar a colonizar al huésped y contribuye a la persistencia de los microorganismos en objetos inanimados (Ortega, 2015c: p.6). La mutación de levaduras a hifas provoca un mayor grado de infección, en las candidiasis invasoras, principalmente en *Candida albicans*. Durante el crecimiento de las hifas, se expresan enzimas como las aspartil proteasas, fosfolipasa, lipasas, fosfomonoesterasas y hexosaminidasas que favorecen la invasión y destrucción de los tejidos (Ortega, 2015d: p.7). Una vez alcanzado un entorno favorable, liberan farnesol, bloqueando la transición de la levadura a hifa, para volver a un crecimiento levaduriforme, facilitando el proceso de difusión a través del torrente sanguíneo (Ortega, 2015e: p.7).

1.14. *Saccharomyces cerevisiae*

1.14.1. *Taxonomía de Saccharomyces cerevisiae*

Tabla 3-1: Clasificación taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*

Clasificación taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Reino	Hongo
División	Amastogomycota
Clase	Ascomycetes
Subclase	Hemiascomycetidae
Orden	Endomycetales
Familia	Saccharomycetaceae
Subfamilia	Saccharomycetidae
Genero	Saccharomyces
Especie	Cerevisiae

Fuente: (Nieto, 2009a: p.12)

Realizado por: Cristina Daquilema.

1.14.2. Descripción y características generales *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es un hongo que se encuentra en las plantas, frutas, suelos y se utiliza ampliamente en la industria para la producción de alimentos y bebidas tales como: pan, cerveza y vino (Souza et al., 2013a: p206). Su nombre deriva del vocablo Saccharo (azúcar), myces (hongo) y cerevisiae (cerveza). Esta levadura heterótrofa obtiene la energía a partir de la glucosa y tiene una elevada capacidad fermentativa. Puede aislarse con facilidad en plantas y tierra, así como del tracto gastrointestinal y genital humano (Suárez et al., 2016a: p.21).

Se puede inactivar a *Saccharomyces cerevisiae* por temperatura para el uso como fuente de nutrimentos en alimentación animal y humana, tanto en forma de levadura íntegra como a partir de sus derivados. Esta levadura es una de las especies considerada como microorganismo GRAS (generalmente reconocido como seguro), por lo que ha sido aprobada para su uso como aditivo alimentario (Suárez et al., 2016b: p.21).

Esta levadura posee un efecto probiótico, tanto en poligástricos como en monogástricos (aves y cerdos, principalmente). En los últimos tiempo *Saccharomyces cerevisiae*, se ha convertido en una herramienta a gran escala de análisis al ser un organismo unicelular con gran facilidad de cultivo y velocidad de división celular, aproximadamente dos horas (Casas, 2018a: pp.4-6).

1.14.3. Morfología de *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae posee forma esférica, elíptica y cilíndrica, con diámetro de 2.5 a 10 micras de ancho y 4.5 a 21 micras de largo. Formada por una pared celular y membrana citoplasmática conteniendo el núcleo, una vacuola y numerosos gránulos y glóbulos de grasa. No contiene flagelos u otros órganos de locomoción. La pared celular está integrada por polímeros de glucosa y manosa, con cantidades pequeñas de proteínas, lípidos y quitina (Nieto, 2009b: p.13).

Sus colonias son de color crema o blanco, apariencia húmeda y brillante, de bordes irregulares, la temperatura óptima de crecimiento es de 25-30°C. Microscópicamente se observa redonda y ovoides, elipsoides y a veces cilíndrica y filamentosas. Fermenta glucosa, galactosa, sacarosa y maltosa, no fermenta lactosa, pero asimila galactosa, sacarosa, maltosa y rafinosa, soporta una aireación óptima es de 0.6-0.9vvm (Fajardo y Sarmiento, 2007a: pp.39-40). Tiene característica de ser

una levadura Crabtree positiva, cuando existe condiciones aerobias, si la concentración de glucosa en el medio es alta, esta levadura no presenta una respiración aerobia sino un metabolismo fermentativo, produciendo alcohol rápidamente y desplazando por competencia a otros microorganismos en principio no deseables en la fermentación vínica (Gutiérrez, 2017a: pp-17-18).

Posee un carácter “killer”, donde produce secreciones por parte de ciertas cepas, a la cual ellas son inmunes matando a células sensibles las cuales pueden ser del mismo o diferentes géneros, este fenómeno killer se puede considerar como un método alternativo para el control de levaduras no deseadas (Gutiérrez, 2017b: p.19).

1.14.4. Requerimientos nutricionales de *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae necesita ciertos nutrientes y condiciones ambientales para su adecuado crecimiento y reproducción, alguno de los elementos son básicos como el carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio magnesio y micronutrientes como, cobalto, bario, cadmio, cromo, yodo, níquel y bario, en concentraciones de 0.1-100 Um (Buitrago y Tenjo, 2007a: p.8).

El carbono actúa como fuente de energía y como material constitutivo de la masa celular. El nitrógeno constituye el 10% del peso seco de la levadura, se encuentra en la célula formando parte esencial de las proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos; el fósforo se halla en los ácidos nucleicos, en la lecitina y en diversos compuesto fosforilados, participa en el proceso de degradación oxidativa y de intercambio energético. Para que estas fuentes sean aprovechadas por la levadura deben estar en forma asimilable (Buitrago y Tenjo, 2007b: pp.9-10).

1.14.5. Composición química

Las levaduras contienen un 75% de agua y 25% de materia seca aproximadamente. La composición de materia seca de levadura se presenta en Tabla 4-1.

Tabla 4-1: Composición química de levaduras

COMPONENTES	PORCENTAJE (%)
Ceniza	7
Carbohidratos	43
Proteínas	48
Grasas	2

Fuente: (Fajardo y Sarmiento, 2007b: p.42)

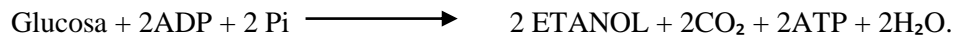
Realizado por: Cristina Daquilema

Los minerales de las levaduras representan del 5-9% del peso seco. Los componentes principales son ácido fosfórico, cerca de 50% y potasio del 30%, mientras que las sustancias nitrogenadas de las levaduras representa unas dos terceras partes del peso seco (30-75%), contienen entre 5-12% de nitrógeno, estas sustancias se reparte en un 64% de proteínas, 10% de peptonas y aminoácidos, 8% de amonio, 105 de purina y el resto consiste en pirimidinas y vitaminas (Fajardo y Sarmiento, 2007c: p.42).

1.14.6. Metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae puede llevar a cabo un metabolismo respiratorio o fermentativo de acuerdo a las concentraciones de oxígeno. En condiciones aerobias aumenta la biomasa y produce poco alcohol, pero en anaerobiosis el crecimiento celular es lento, la producción de etanol es alta. Por ello, la oxidación completa de la fuente de carbono a CO₂ y H₂O, presenta una producción celular óptima, y en concentraciones altas de oxígeno disuelto la fermentación de azúcar a etanol es inhibida (Buitrago y Tenjo, 2007c: p.11)

Esta levadura convierte la glucosa a etanol a través de la ruta de la glucólisis, vía ubicua para el catabolismo de los monosacáridos. La glucólisis presenta dos etapas: una de hexosas, donde el ATP es consumido y una etapa de triosas, donde se gana ATP. La fermentación alcohólica presenta dos pasos: el piruvato es descarboxilado por la piruvato descarboxilasa hasta acetaldehído, el cual es reducido a etanol por alcohol deshidrogenasa con liberación de NAD proveniente de la glucolisis. El etanol y CO₂ son productos finales de la fermentación alcohólica (Buitrago y Tenjo, 2007d: pp.11-12).



1.14.7. Aplicaciones de *Saccharomyces cerevisiae*

1.14.7.1. A nivel industrial

En la actualidad, *Saccharomyces cerevisiae* se emplea para la producción de alcohol deshidrogenasa, gliceraldehído-3-hidrogenasa, hexoquinasa, lactato hidrogenase, glucosa 6-fosfato hidrogenase, así como Coenzima A, nucleótidos difosfopiridinos. También se utiliza en la producción de bebidas alcohólicas, en la industria repostería y en la agricultura, así como para fines investigativos y tecnológicos (Suárez et al., 2016c: p.24). Por la escases del petróleo a nivel mundial y los precios excesivos de éste, sea planteado el uso de alcohol como combustible, en la actualidad son varios los países que están estudiando el empleo del etanol, obtenido de la biomasa, como combustible, bien como componente único o en mezclas con gasolinas (Suárez et al., 2016d: p.25).

1.14.7.2. Alimento animal

Saccharomyces cerevisiae, posee un alto valor proteico (40-45 %), por ello se emplea como suplemento alimenticio para rumiantes, mejorando el rumen, por la disminución de la cantidad de oxígeno, favoreciendo la anaerobiosis y estimulando el crecimiento de bacterias celulíticas y así mejora la respuesta productiva del animal (Suárez y Guevara, 2017a: p.21)

Los cultivos de levadura desecada aportan enzimas, el uso de *Saccharomyces cerevisiae* en forrajes para el ganado, dio un incrementos en el consumo de alimento, además otros estudios demostraron que la utilización de levadura incrementa la producción de leche y/o carne entre 5 y 8 %, existiendo variabilidades entre los resultados (Suárez y Guevara, 2017b: pp.24-25). La crema elaborada de *Saccharomyces cerevisiae*, se emplea en distintas proporciones como parte de la dieta animal, 10% en bovinos, 5% en ovinos y en las aves entre 3 y 4%. El uso de *Saccharomyces cerevisiae* vivo se recomienda para la alimentación animal en dosis de 1g por cada 100 kg de peso, y esta debe permanecer metabólicamente activa para que resulte funcional (Suárez y Guevara, 2017c: p.26).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

El presente trabajo de Investigación se ejecuta metodológicamente a través de las siguientes fases

- Selección del apicultor proveedor de miel genuina
- Definición metodológica de la concentración no letal de miel de abeja para su contaminación experimental con levaduras.
- Diseño del dispositivo para la ejecución de los tratamientos de ozonización de solución salina de miel de abeja al 50% contaminada con levaduras.
- Ejecución de los tratamientos de ozonización de las soluciones salinas de miel de abeja al 50% no letal para las levaduras.
- Monitoreo del proceso de fermentación, cuantificando UPC y mediante medición de CO₂. (definición de posible comportamiento fungistática)
- Análisis estadístico.
- Socialización del mejor tratamiento de ozonización a ASOPROACH

2.1. Lugar de la Investigación

- Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos. ESPOCH. Facultad de Ciencias.
- Laboratorio de Bromatología. ESPOCH. Facultad de Ciencias.
- Laboratorio de Microbiología. ESPOCH. Facultad de Ciencias.
- Farmacia Silvana N°2. Riobamba. La Dolorosa.

2.2. Tipo de Investigación

El trabajo es de tipo experimental al buscar analizar el efecto fermentativo de las levaduras presentes en una solución salina de miel de abeja contaminada experimentalmente, tras un

tratamiento de ozonización, donde se manipulan las variables: concentración de ozono y tiempo de ozonización con tres repeticiones.

2.3. Ejecución metodológica.

2.3.1. Selección del apicultor proveedor de miel genuina

La selección del apicultor se realiza en función de las necesidades y en relación a la disponibilidad de ellas en la asociación (muestreo por interés). Se decidió trabajar con un apicultor de ASOPROACH que tiene las siguientes características: dispone de un equipo ozonizador (Biomagnetix con regulación de caudal de ozono) y permisos para su manipulación, apiario propio con buena práctica de manejo y almacenamiento de miel de tal forma que garantiza la genuinidad de ella, producción de un volumen mayor a 50 litros de miel por cosecha, visión emprendedora para la factibilidad e interés de realizar preparados naturales y medicinales, espacio físico adecuado de su propiedad.

2.3.2. Definición metodológica de la concentración no letal de miel de abeja para su contaminación experimental con levaduras.

La miel de abeja genuina por referencias bibliográficas, presenta contaminación microbiana en su superficie (Salamanca *et al.*, 2000, pp.4-5). Para el tratamiento de ozonización existió el previsible inconveniente de la aplicación de este gas, por la elevada viscosidad de la miel, particularidad que direcciona el trabajo para investigar la ozonización en una solución salina de miel de abeja genuina, situación que exigió metodológicamente determinar una concentración acuosa de miel, que se catalogó como no letal para las levaduras evitando la interferencia entre el efecto de la concentración de azúcar con el efecto del ozono sobre las levaduras, objeto a evaluar. Encontrada la concentración no letal para las levaduras, se tuvo las condiciones para poder diseñar y ejecutar las pruebas de ozonización en la miel.

2.3.2.1. *Material biológico.*

Cepa comercial de levadura de fácil adquisición, para facilitar la reproducibilidad del trabajo y una cepa pura.

- *Saccharomyces cerevisiae*, “LEVAPAN[®]”.

En forma deshidratada, la cual se reactivó en un cultivo selectivo para levaduras.

- *Candida albicans*, cepa pura código ATCC 10231.

Revitalizado con suero fisiológico.

2.3.2.2. *Materiales y equipos*

- Jeringuillas de 60 mL NIPRO
- Vaso de precipitación de 50 mL
- Varilla de agitación
- Probeta de 25 mL
- Playo
- Fósforos
- Estufa bacteriológico
- Baño María

2.3.2.3. *Procedimiento*

- Se prepara individualmente dos inóculos: *Saccharomyces cerevisiae*, (*) y *Candida albicans* (**).
- La cantidad del inóculo requerido para procesos de fermentación, en la mayoría de los casos, es el 10% del volumen total de trabajo (Hernández, 2003, p.28).
- Basándose a lo expuesto, se procede a realizar la inoculación, ajustándose a las necesidades del trabajo.

- El volumen del trabajo experimental realizado fue de 30 mL de solución salina de miel de abeja.
- Se diluye 3 mL de inóculo con 3 mL de suero fisiológico y se completó con suero hasta conseguir los volúmenes finales de inóculos salinos que se indican en la Tabla 1-2.

Tabla 1-2: Especificaciones de volúmenes de inóculos y de suero fisiológico utilizado

Volumen de inóculo de cepas de levaduras.	Suero fisiológico	Adición de suero fisiológico	Volúmenes finales de inóculos salino
3 mL	3 mL	3 mL	6 mL
3 mL	3 mL	6 mL	9 mL
3 mL	3 mL	9 mL	12 mL
3 mL	3 mL	12 mL	15mL

Fuente: Análisis de laboratorio

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

- Con los volúmenes finales de inóculos salinos se prepara soluciones salinas de miel abeja genuina (30 mL), a cuatro concentraciones (80% v/v, 70% v/v, 60 % v/v, 50 % v/v), como se presenta en la Tabla 2-2.

Tabla 2-2: Preparación de cuatro concentraciones de soluciones salinas de miel de abeja.

Volumen añadido de miel de abeja genuina calentada a 35 °C por 5 min	Volumen Inoculo salino	Volumen final de muestra	Concentraciones de soluciones salinas de miel de abeja $C1V1=C2V2$
24 mL	6 mL	30 mL	80% (v/v)
21 mL	9 mL	30 mL	70% (v/v)
18 mL	12 mL	30 mL	60% (v/v)
15 mL	15 mL	30 mL	50% (v/v)

Fuente: Análisis de laboratorio

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

- A cada concentración de solución salina de miel de abeja se le procesa inmediatamente de la siguiente manera.
 - Con una jeringuilla inyectable NIPRO de 60 mL, se absorbe los 30 mL de solución salina de miel de abeja, evitando la formación de burbujas (importante).
 - Se sella la punta de la jeringuilla y se incuba a 35°C (al mismo tiempo todas las jeringuillas de las 4 soluciones).
- El objeto de este procedimiento es detectar cuál de las cuatro concentraciones muestra fermentación, con la finalidad de definir la concentración de azúcar de la miel a la cual las levaduras logran resistir y de ese modo evitar la interferencia con el efecto del ozono.

(* Preparación de inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*)

- Pesar 2,5mg de cada levadura y disolver en 10 mL cultivo selectivo para levadura. (preparación de cultivo selectivo apartado 2.3.5.1. literal d (*****)).
- Homogenizar por completo e incubar a 29°C por 24 horas.
- Con pipetas automáticas, se pipeteó 100µL de muestra y se sembró en cajas de agar sabouraud y se incubó a 29°C por 48 horas.
- Con un asa esterilizada en presencia de un mechero se toma de dos a tres colonias.
- Sumergir y homogenizar en un tubo con 10 mL de suero fisiológico.
- Y ajustar a la escala 0,5 Mc. Farland,

(**) Preparación de inóculo de *Candida albicans* ATCC 10231

- De cajas cultivadas de *Candida albicans* realizar la resiembra de la cepa.
- Tomar de dos a tres colonias y suspender en 10mL suero fisiológico.
- Con pipetas automáticas y puntas estériles, se tomó 100µL de muestra, y se realizó la siembra en cajas de agar sabouraud y se incubó a 37°C de 24 a 48 horas.
- Con un asa esterilizada en presencia de un mechero se toma de dos a tres colonias.
- Sumergir y homogenizar en un tubo con 10 mL de suero fisiológico.
- Y ajustar a la escala 0,5 Mc. Farland.

2.3.3. *Diseño del dispositivo para la ejecución de los tratamientos de ozonización de solución salina de miel de abeja al 50% contaminada con levaduras.*

Se diseña un dispositivo que en lo ideal debería ser de fácil manejo y transporte, debe permitir la entrada del ozono graduado proveniente de un equipo ozonizador (Biomagnetix). Como recipiente principal se utiliza un embudo de separación de una capacidad mínima de 100 mL de tal forma que no existan derrames de muestra de solución salina de miel de abeja durante el burbujeo de ozono, acción que ocurrirá obligatoriamente en el fondo del embudo de separación. El tapón del embudo debe tener un ingreso hasta el fondo para el ozono y una salida de seguridad de presión de gas. El diseño busca asegurar y homogenizar el procedimiento posterior de la totalidad de muestra que será recolectada, para el análisis y evaluación de los indicadores que prevé la investigación.

2.3.3.1. *Materiales, equipos y especificaciones*

“Los materiales que se menciona a continuación, deben ser utilizados obligatoriamente, con la finalidad de garantizar la replicabilidad de los resultados”.

- Embudo de separación graduado

Tabla 3-2: Especificaciones del embudo de separación utilizado en el dispositivo.

ESPECIFICACIÓN	DIMENSIONES
Marca	Germany
Material Elaborado	Vidrio Borosilicato
Volumen	100 mL
Espesor	0,25mm
Diámetro externo de la embocadura taponable	7,2 cm

Fuente: Análisis de laboratorio

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

- Material de laboratorio o complementos

Tabla 4-2: Especificaciones del material de laboratorio utilizado experimentalmente.

MATERIAL DE LABORATORIO UTILIZADO	ESPECIFICACIONES	
Tubo blanco compacto	Largo	7 cm
	Diámetro:	4 mm
Manguera del equipo de venoclisis	Color:	Traslucido
	Largo	50 cm
	Diámetro	2.5 mm
Aguja	Número	15”
Tapón de caucho negro con orificio	Número del tapón	7”
	Diámetro del orificio	4 mm
Manguera flexible de acuario	Largo	30 cm

Fuente: Análisis de laboratorio.

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

- Equipo ozonizador BIOMANGENTIX

Tabla 5-2: Características del equipo ozonizador.

EQUIPO OZONIZADOR “BIOMAGNETIX”	CARACTERÍSTICAS DEL EQUIPO UTILIZADO	
	Posee adición de O ₂ con flujo de 0,5 L/min para 100 µg/mL de ozono.	
	Con control automático del volumen de O ₂ /O ₃ .	
	Con pantalla LCD para visualización del tiempo y concentración de ozono	
	Perilla individual para manejo del tiempo y concentración de ozono.	
	Luz indicadora de encendido de los tratamientos.	
	Con botón de encendido y apagado ON/OFF del equipo.	
	Extensión para toma corriente (110-220) Vol. C.A.	
	Regulador interno y externo de presión.	
	Sensor digital de presión.	
	Válvula para vacío y destrucción de Ozono (O ₃).	
	Permite monitorear el porcentaje de la dosis administrada a lo largo del tratamiento	
	Dosificador manual de (O ₃), volumen y concentración.	
	Mangueras de entrada y salida	
	Válvula de entrada de Oxígeno O ₂ .	
Válvula de salida de Ozono (O ₃) para jeringa.		

Fuente: Análisis de laboratorio

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

2.3.3.2. Armado del dispositivo

Se describe a continuación paso a paso el montaje y armado del dispositivo, una vez introducida la muestra.

- Tapar la embocadura superior del embudo de separación de 100 mL con un tapón de caucho que debe tener un orificio. **Figura 1-2. (A)**
- Introducir un tubo compacto blanco de 7cm por el orificio del tapón de caucho. **Figura 1-2 (B)**
- Deslizar a través del tubo compacto una manguera traslucida de 50 cm totalmente aséptica, sellar la unión de tubo-manguera con teflón. **Figura 1-2 (C)**
- Conectar herméticamente la manguera colocada en el embudo con la manguera de salida de ozono del equipo ozonizador BIOMANGENTIX. **Figura 1-2 (D)**
- Incrustar completamente una aguja aséptica número 15” por el tapón de caucho (seguridad de presión). **Figura 1-2 (E)**
- Terminado el tratamiento de ozonización se deberá retirar el tapón de caucho y manguera del embudo de separación e introducir una pipeta de 10 mL hasta el fondo del embudo de separación y tomar una alícuota de 10 mL de muestra para el análisis microbiológico. **Figura 1-2 (F)**
- Conectar la salida del embudo de separación con una jeringuilla inyectable NIPRO de 60 mL utilizando una manguera flexible de acuario de 30 cm, asegurar hermeticidad en las conexiones **Figura 1-2 (G)**
- Abrir la llave del embudo de separación y absorber la muestra con la jeringuilla y sellar inmediatamente y herméticamente la punta de la jeringuilla. **Figura 1-2 (H)**

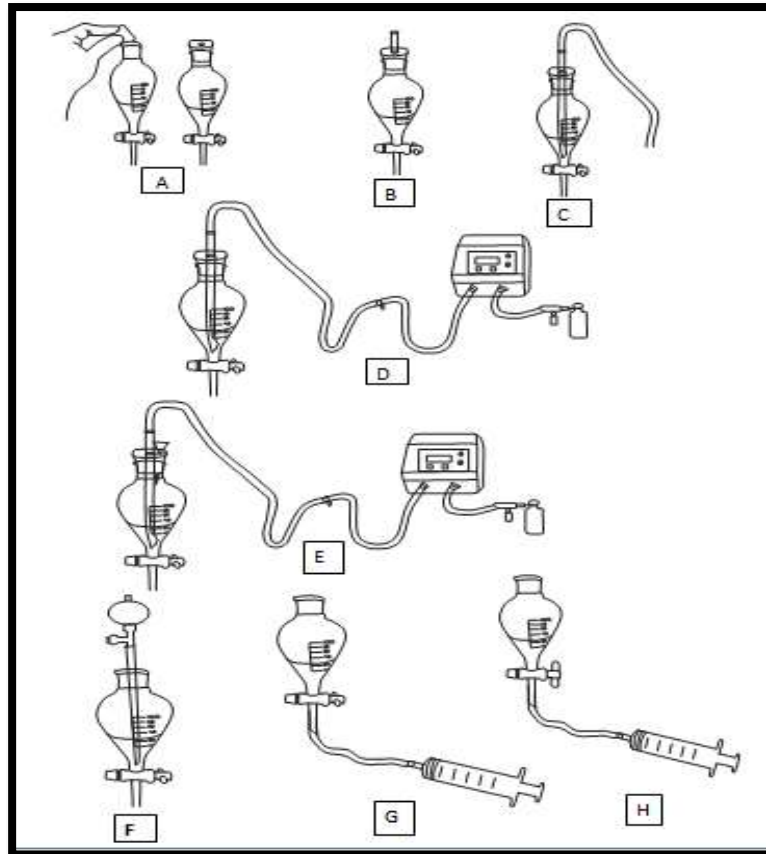


Figura 1-2: Proceso de armado de dispositivo para tratamiento de ozonización

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

2.3.4. Ejecución de los tratamientos de ozonización de las soluciones salinas de miel de abeja al 50% no letal para las levaduras.

Realizar tratamientos individuales de ozonización sobre soluciones salinas de miel de abeja al 50% contaminadas con dos cepas de levaduras individualmente, utilizando el dispositivo diseñado para el efecto, aplicando concentraciones de ozono a un tiempo de exposición con blancos correspondientes en cada tratamiento, datos que se detallan a continuación.

2.3.4.1. Diseño del tratamiento de ozonización de soluciones salinas de miel de abeja al 50% contaminadas.

Luego de algunos ensayos se procede a establecer los tratamientos de ozonización de las soluciones salinas de miel de abeja al 50% contaminada, los mismos que serán: tres

concentraciones de ozono (99 ppm, 59 ppm, 19 ppm), tiempo constante de exposición de 60 min, por triplicado, utilizando el dispositivo diseñado.

El indicador para determinar el efecto letal del ozono serán: los mL de CO₂ desplazados y el recuento microbiológico de viables, luego de los tratamientos.

2.3.4.2. Preparación de la solución salina de miel de abeja al 50% contaminada para los tratamientos de ozonización.

Establecida la concentración límite no letal para las levaduras, se prepara 38 mL de solución salina de miel de abeja al 50%, volumen que será utilizado en cada tratamiento de ozonización.

- Para conseguir los 38 mL de solución salina de miel de abeja al 50%, diluir 19 mL de miel de abeja, con una mezcla de 19 mL de inóculo, más suero fisiológico (volumen que complete los 19 mL de mezcla). Esta elaboración se observa en la Tabla 6-2.

Tabla 6-2: Preparación de 38 mL de solución salina de miel de abeja al 50%.

Volumen de inóculo salino. (19 mL)		Volumen de miel de abeja genuina calentada a 35 °C por 5 min	Volumen final de solución salina de miel de abeja al 50% C1V1=C2V2
Mililitros de inóculo de cepas de levaduras	Mililitros de suero fisiológico		
3,8 mL	15,2 mL	19 mL	38 mL

Fuente: Análisis de laboratorio

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019 .

- La preparación de los inóculos, se describe en el apartado 2.3.2.3 (*) (**).
- Se homogeniza totalmente y se transfirió la solución al embudo de separación de 100 mL
- Acondicionar el embudo de separación, el detalle del acondicionamiento y armado del dispositivo se describe en el apartado 2.3.3.2

2.3.4.3. Ozonización de solución salina de miel al 50%.

La investigación requirió del equipo médico Ozonoterapia Digital Automático BIOMAGNETIX, facilitado por un socio de ASOPROACH.

- A la muestra de solución salina de miel de abeja al 50% elaborada y ubicada en el embudo de separación, se insertan las mangueras donde deberán llegar hasta el fondo del embudo de separación, según detalla el apartado 2.3.3.2
- Se procede a ozonizar, encendiendo el equipo, que deberá estar configurado: el tiempo y la concentración de ozono de inyección mediante la perilla correspondiente.
- Realizada la configuración anterior, abrir la perilla de salida de oxígeno (una vuelta) y se configura el flujo de salida de oxígeno en un valor de 1.
- Durante todo el proceso de ozonización, mantener en movimientos circulares al embudo de separación de 100 mL.
- Una vez terminado el proceso de ozonización, se cierra la salida del tanque de oxígeno y se ajusta a 0 el flujo de salida, para cortar definitivamente el burbujeo.
- Retirar las mangueras de entrada de ozono del embudo de separación.
- Tomar de muestras:

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

- Tomar asépticamente 10 mL de muestra ozonizada directo del embudo de separación en un tubo estéril, utilizando una pipeta graduada y guardar en un cooler, para ser transportado al laboratorio de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

PRUEBA DE FERMENTACIÓN

- Conectar la salida del embudo de separación con una jeringuilla inyectable NIPRO de 60 mL a través de una manguera flexible (de acuario) de 15 cm, asegurar hermeticidad en las conexiones.
- Abrir la llave de seguridad y absorber la muestra directamente con la jeringuilla, asegurar ausencia de burbujas y sellar herméticamente la punta de la jeringuilla.
- Cada jeringuilla se etiquetó y se guardó en un cooler, para ser transportada al laboratorio de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH y posteriormente se incubó a 29° C, para monitorear el proceso de fermentación.

Nota: La muestra BLANCO (muestra sin ozonizar) es colocada en el embudo de separación, debiendo ser absorbida de manera inmediata con una jeringuilla NIPRO de 60 mL y tomar de la misma una alícuota de 10 mL, manteniendo las mismas condiciones de trabajo.

2.3.5. Monitoreo del proceso de fermentación, cuantificando UPC y mediante medición de CO₂. (Definición de posible comportamiento fungistática).

Una vez realizado el tratamiento de ozonización, se procede a tomar dos muestras desde el embudo de separación:

- La primera muestra se toma para el análisis microbiológico, transfiriendo una alícuota de 10 mL de muestra ozonizada (sin fermentar T=0 h) directamente del embudo de separación a un tubo estéril, las muestras se trasladaron en cooler al laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencia de la ESPOCH.
- La segunda muestra se toma para el proceso de fermentación, en jeringuillas y se trasladan en cooler al laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencia de la ESPOCH, para que se desarrolle la fermentación y realizar un análisis microbiológico al final de la misma, la fermentación se monitoreo midiendo el desplazamiento del embolo en la jeringuilla debido a la presión ejercida del CO₂. Se requirió ejecutar dos pruebas anexas confirmatorias sobre un comportamiento experimental reiterativo observado en el proceso de fermentación, en que en un rango de tiempo la fermentación es inexistente y posteriormente se observa un desplazamiento del émbolo de la jeringuilla, lo que hizo sospechar dos posibilidades, generación de oxígeno por descomposición del ozono o de un comportamiento fungistática o fungicida del ozono.

2.3.5.1. Análisis microbiológico de muestra ozonizada sin fermentar (T=0 h).

Una vez realizado el tratamiento de ozonización a las muestras de solución salina de miel de abeja al 50%, se prosigue a realizar el estudio microbiológico de las alícuotas de 10 mL tomadas en tubos estériles en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH. Con el objetivo de analizar el efecto del ozono sobre las levaduras expuestas en la muestras, mediante el recuento unidades propagadoras de colonias (UPC).

a. Materiales y equipos

- Erlenmeyer 250 mL
- Tubos estériles de vidrio de 10 x 5 cm
- Pipetas automáticas 1000 μ L, 100 μ L.
- Algodón y gasa estéril
- Cajas Petri
- Asa de vidrio
- Mechero
- Parafilm
- Estufa bacteriológica a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

b. Distribución de agua peptonada

Para el estudio, se prepara suficiente cantidad de agua de peptona al 0.1 % en Erlenmeyer individuales de 250 mL de capacidad y se reparte 9 mL en 3 tubos dejando en el matraz 90 mL de agua de peptona, se les cubre con tapones de gasa y algodón y se autoclava a 121°C , 15 PSI durante 30 minutos.

c. Dilución de las muestras a sembrar

El procedimiento de las diluciones de las muestras ozonizadas se describe a continuación.

- Las alícuotas de 10 mL de las muestras ozonizadas se retiran del cooler.
- Se trasvasa los 10 mL de muestra al Erlenmeyer que contiene los 90 mL de agua de peptona estéril, agitar la muestra manualmente con movimientos de arriba abajo, efectuándose por un tiempo de 7 segundos. Esta muestra se conoce como la dilución 1:10 o dilución madre.
- En condiciones asépticas, transferir 1.0 mL de la dilución madre al tubo 1 que contiene 9.0 mL de agua de peptona estéril, evitar el contacto entre la pipeta y el agua de peptona. La dilución que haya ahora en este tubo es 1:100 o dilución 10^{-2} .
- Del tubo 1, tomar 1.0 mL de muestra y se pipetea en el tubo número 2. Obteniendo la dilución 1:1000 o dilución 10^{-3}

- De la mismo modo del tubo 2 se toman 1.0 mL y se pipetea al tubo 3. Teniendo la dilución 1:10000 o dilución 10^{-4} .

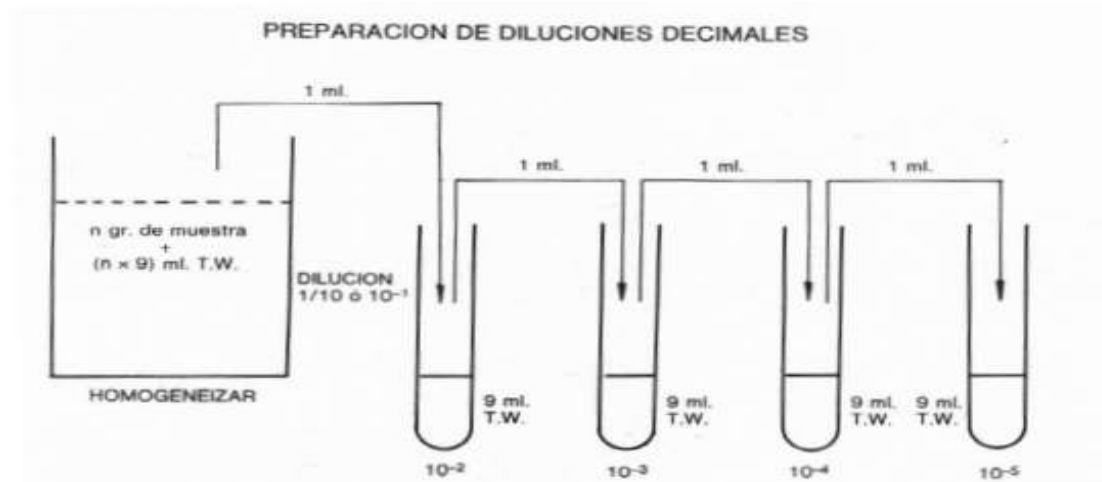


Figura 2-2: Preparación de diluciones decimales

Fuente: (Alonso, 2013, p.4).

d. Recuento de viables (Norma ISO 11133)

La siembra se realiza por triplicado de la dilución 1:1000 ó 10^{-3} .

- Del tubo 2 se toma 100 μ L de muestra individualmente y se pipetea sobre cajas de agar sabouraud previamente codificadas, la preparación del medio de cultivo se describe a continuación (****)
- Con asas de vidrio estériles se realiza la siembra por extensión en superficie.
- Una vez sembrada la muestra, cada caja se sella con parafilm y se incuba en forma invertida a 29°C por 24 horas.
- En caso de *Candida albicans* se incubo a 37°C por 48 horas.

(****) Preparación de agar sabouraud para hongos

Se prepara una cantidad suficiente de agar sabouraud en un Erlenmeyer de 500 mL, (ver detalle en el envase), se homogeniza y se autoclava a 121°C, 15 PSI durante 30 minutos. El medio de cultivo se distribuye asepticamente 15 mL por placa en una cabina de flujo laminar. Una vez sólidas se almacenan en refrigeración en bolsas plásticas.

(*****) Preparación de cultivo selectivo para levaduras.

La preparación del cultivo selectivo para la dilución de las levaduras se basó en revisión bibliográfica y se optó por medio de cultivo descrito por Claudia Acevedo G y colaboradores.

Actividad de distintas presentaciones comerciales de *Saccharomyces boulardii*

(Acevedo G. et al., 2004, p.2). En donde la composición del medio de cultivo fue la siguiente: Peptona 2.5 g, D-glucosa 5.0 g, extracto de levadura 3.0 g, NaCl 0.5 g, para un litro de agua destilada y ajustado. Cada frasco se inoculó con el total del contenido en cada cápsula o sobre, correspondiente a 250 mg de *S. boulardii*. Para el desarrollo del trabajo de investigación, se ajusta a nuestras condiciones la composición del medio de cultivo ya descrito, obteniéndose la siguiente composición: Peptona 0.1g, D-glucosa 0.2g, Extracto de levadura 0.12 g y NaCl 0.02 g para una volumen de 40 mL de agua destilada y con 2,5 mg de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se reparte 10 mL del medio de cultivo en 4 Erlenmeyers individuales de 125 mL previamente estériles y cubiertas con tapones de gasa y algodón. Se autoclava a 121°C, 15 psi por 30 minutos y se enfriaron. Para *Candida albicans* no se hizo uso del medio mencionado. Se utiliza suero fisiológico para reactivación del microorganismo.

e. Lectura de resultados

- Las cajas son examinadas después de 24 horas.
- En caso de *Candida albicans* se examinó a las 48 horas
- Se verifica si existe crecimiento de colonias.
- Se realiza el conteo de todas las colonias de cada caja y se registra la fecha y hora.

2.3.5.2. Monitorización del proceso de fermentación de la muestra ozonizada.

Para realizar la gráfica de fermentación, se considera como 0 mL o punto de partida al volumen tomado del embudo, los 28 ml de muestra ozonizada, y a su vez los 32 mL se considera como 60 mL (finalización del proceso de fermentación).

Se detalla a continuación el proceso realizado para monitorear la fermentación generada una vez realizado el tratamiento.

- Retirar las muestras del cooler e introducir en la estufa a 29°C.
- Anotar el día y hora de ingreso de las muestras a la estufa.
- Observar si existe algún tipo de cambio en las muestras que pudiese indicar el inicio del proceso de fermentación. (burbujeo de las muestras de las jeringuilla).
- Anotar diariamente los mililitros desplazados por el émbolo de la jeringuilla que exista y la hora de cada desplazamiento hasta que marque 60 mL, ***volumen considerado para valorar la finalización del proceso de fermentación.***
- Con los datos obtenidos elaborar la curva del proceso de fermentación (mL de CO₂ vs tiempo de fermentación)
- Mediante la gráfica realizada determinar el tiempo de ausencia de fermentación, en el rango de fermentación programado de 0 a 60 mL.

Nota: a partir del segmento de tiempo de bloqueo momentáneo de la fermentación, se observa generación gaseosa, particularidad que direcciona al trabajo a definir ese comportamiento, realizando pruebas anexas, las mismas que metodológicamente se aplican y se detallan a continuación.

2.3.5.3. Pruebas confirmatorias anexas al procedimiento de monitorización del proceso de fermentación.

La generación gaseosa se busca explicar desde dos posibilidades:

- a) Formación de oxígeno por descomposición de ozono.
- b) Cuantificación de UPC de las muestras ozonizadas fermentadas.

2.3.5.4. Valoración de oxígeno molecular por degradación de ozono.

Fundamento: El color azul, se debe a la forma oxidada del azul de metileno, la glucosa en medio básico hace que predomine la forma reducida del azul de metileno, el cual es incoloro. Al burbujear el oxígeno generado por degradación del ozono hace que vuelva a predominar la forma oxidada del azul metileno, tornándose azul.

La valoración de oxígeno molecular se ejecuta con el objetivo de analizar si el desplazamiento del émbolo que se evidencia a partir del tiempo de bloqueo momentáneo de la fermentación hasta llegar a los 60 mL, (finalización de fermentación), se debe a la presencia de oxígeno (producto de

degradación del ozono). El ozono es un gas inestable con un tiempo de vida media de 45 min a 20°C, descomponiéndose en oxígeno atómico y oxígeno molecular.

Procedimiento

- Verter aproximadamente 50 mL de agua destilada en un kitasato de 100 mL.
- Añadir 2 lentejas de Hidróxido de sodio (NaOH).
- Tapar con tapón limpio o papel aluminio y mezclar.
- Una vez mezclado, añadir 0.80 g de glucosa y homogenizar
- Incorporar 4 gotas de azul de metileno y volver a mezclar
- Incorporar un tapón de caucho limpio, a través del agujero del tapón introducir una manguera flexible.
- La manguera debe estar en el interior de la solución.
- Esperar hasta que la solución se torne transparente
- Tomar las jeringuillas ya fermentadas y realizar una punción en la punta de la jeringuilla e introducir en el interior de la manguera proveniente del kitasato.
- Empujar el émbolo para hacer burbujear el gas existente en la jeringuilla.
- Observa el cambio de color.

Nota: la aparición de color azul al burbujear la muestra indica la presencia de oxígeno.

2.3.5.5. Análisis microbiológico de muestra ozonizada fermentada (cuantificación de UPC)

Se ejecuta el análisis microbiológico a las muestras ozonizadas fermentadas, con el fin de analizar si el motivo del desplazamiento del émbolo en las jeringuillas se debe a una posible producción de la CO₂ como producto de una fermentación alcohólica por la reactivación de las levaduras o el aumento en la biomasa de las mismas. A través de este procedimiento se busca definir un posible comportamiento fungistática, donde el ozono posiblemente inhibe el crecimiento de levaduras por un corto periodo de tiempo o las eliminan parcialmente.

Procedimiento del análisis microbiológico.

El volumen de muestra para el análisis microbiológico fue de 10 mL, tomados directamente de la jeringuilla. La metodología del segundo análisis microbiológico se desarrolla de la misma forma que el primer análisis microbiológico descrito en el apartado superior 2.3.5.1.

2.3.6. Análisis estadístico

Los datos de este trabajo de investigación se tabulan en el sistema estadístico SPSS v 21. Los resultados son analizados mediante el test de ANOVA de un FACTOR y la prueba de Post Hoc, Tukey b según los requerimientos.

2.3.7. Socialización del mejor tratamiento de ozonización a ASOPROACH

Se realiza una exposición general al director del centro de Bioenergía Molecular, Dr. Eduardo Fonseca, terapeuta y demás miembros de ASOPROACH.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Proceso de selección del apicultor de ASOPROACH, proveedor de miel de abeja genuina.

El apicultor seleccionado de ASOPROACH, fue el director del centro de Bioenergía Molecular, Dr. Eduardo Fonseca, terapeuta y miembro ASOPROACH, la selección se debió a que cumplía los requerimientos planteado en la metodología.

3.2 Concentración no letal de miel de abeja para su contaminación experimental con levaduras.

Tabla 1-3: Mililitros de CO₂ desplazados de la fermentación de cuatro concentraciones de soluciones salinas de miel de abeja para definición de la concentración no letal.

Concentraciones de soluciones salinas de miel de abeja	Inóculos utilizadas 0,5 McF	Mililitros de CO₂ desplazados	Resultado de tiempo de fermentación de las muestras a diferentes concentraciones
80% v/v	<i>Candida albicans</i>	0 mL	No se evidenció el proceso de fermentación
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0 mL	No se evidenció el proceso de fermentación
70% v/v	<i>Candida albicans</i>	0 mL	No se evidenció el proceso de fermentación
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0 mL	No se evidenció el proceso de fermentación
60% v/v	<i>Candida albicans</i>	5 mL	Fin de la fermentación a los 4 días.
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8 mL	Fin de la fermentación a los 5 días.
50% v/v	<i>Candida albicans</i>	30 mL	Fin de la fermentación en 2 días y 2 horas.
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30 mL	Fin de la fermentación en 2 días.

Fuente: Análisis de laboratorio.

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

En la Tabla 1-3, se puede evidenciar la presencia o ausencia del proceso de fermentación de las levaduras utilizadas a diferentes concentraciones de soluciones salinas de miel de abeja. El fin de este experimento fue, encontrar la concentración de miel no letal para las levaduras, es decir donde ellas resistan y puedan fermentar con facilidad, evitando la interferencia con el efecto letal del ozono. Las muestras de soluciones salinas de miel de abeja al 50% presentó fermentación, dentro de dos días y dos horas para *Candida albicans*, dos días (48 horas) para *Saccharomyces cerevisiae*, indicando que las levaduras toleran y son capaces de fermentar a esa concentración de la miel. A pesar que todas lograron fermentar, estas lo hicieron a diferentes tiempos, esto se puede deber a la capacidad para adaptarse al medio, el uso de sustrato y el tiempo de generación de cada levadura. Las muestras de soluciones salinas de miel de abeja al 60% fermentaron después de un periodo de tiempo de incubación y luego se detiene, mientras que, las de 70% y 80% no fermentaron.

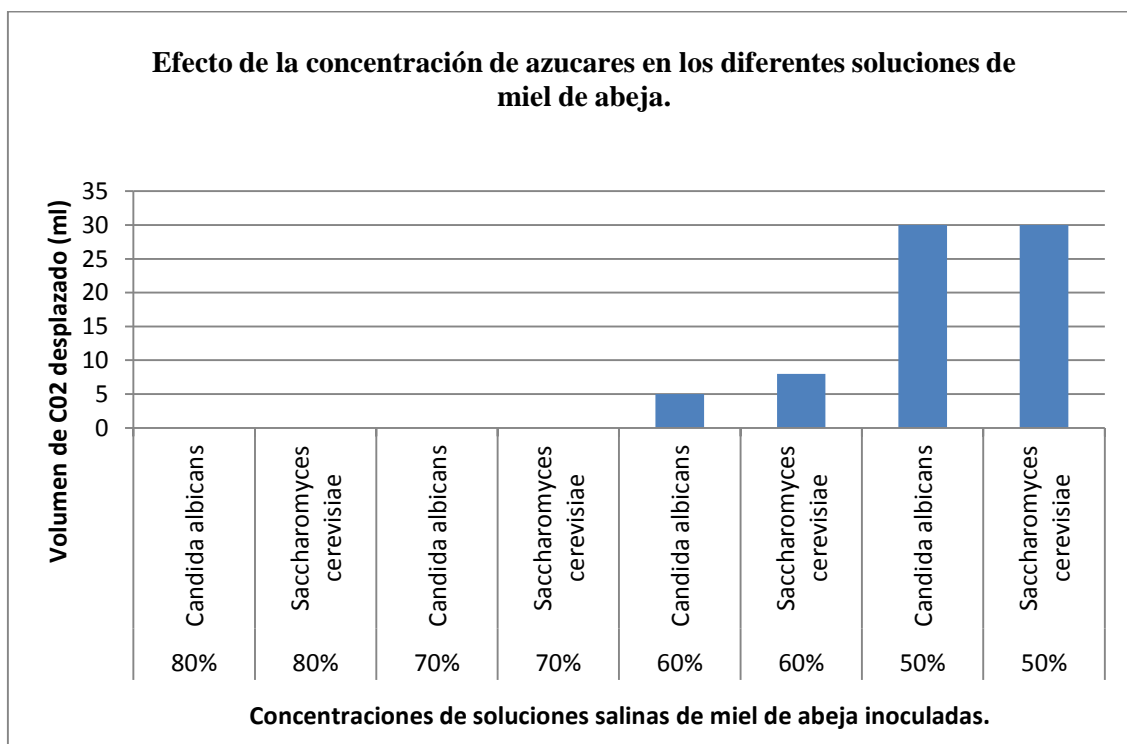


Gráfico 1-3: Letalidad de cuatro concentraciones de soluciones salinas de miel de abeja al 50% sobre tres cepas de levaduras (indicador: mililitros de CO₂ producidos).

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

En el gráfico 1-3 se puede evidenciar los mililitros de CO₂ desplazados en la jeringuilla, tras la fermentación de las levaduras a diferentes concentraciones de miel de abeja. Se observa que, la solución salina de miel de abeja al 50% no presenta efecto letal sobre los dos microorganismos,

presentando fermentación de las levaduras, no así las concentraciones superiores a 60%, que presenta muestra un efecto letal parcial hasta un efecto letal total. En las muestras de soluciones salinas de miel de abeja al 60% se observa un desplazamiento de pocos mililitros de CO₂, donde la muestra inoculada con *Candida albicans* muestra 5 mL de CO₂ desplazados y la muestra inoculada con *Saccharomyces cerevisiae* presenta 8 mL de CO₂ recorridos. Las muestras de las concentraciones de 70% y 80% no presenta desplazamiento. Esto se debe al efecto de la poca disponibilidad de agua para el uso metabólico de las levaduras.

Los resultados observados indicaron que la concentración de solución de miel de abeja al 50% es una concentración no letal para las levaduras, mientras que concentraciones mayores darían un efecto negativo para el seguimiento del efecto del ozono sobre las levaduras.

3.3 Dispositivo diseñado para tratamientos de ozonización de soluciones salinas de miel de abeja.



Fotografía 1-3: Dispositivo para tratamientos de ozonización

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

3.4 Diseño y ejecución de tratamientos de ozonización.

Tabla 2-3: Tratamientos de ozonización de soluciones salinas de miel de abeja al 50%

Microorganismo de interés	Solución salina de miel de abeja 50% (38mL)	Concentración de ozono $\mu\text{g}/\text{mL}$	Tiempo de ozonización. (Por triplicado) (minutos)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> “LEVOPAN [®] ”	Muestra 1	99 $\mu\text{g}/\text{mL}$	60 minutos
	Muestra 2	59 $\mu\text{g}/\text{mL}$	60 minutos
	Muestra 3	19 $\mu\text{g}/\text{mL}$	60 minutos
	Muestra blanco	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0 minutos
<i>Cándida albicans</i> ATCC 10231	Muestra 1	99 $\mu\text{g}/\text{mL}$	60 minutos
	Muestra 2	59 $\mu\text{g}/\text{mL}$	60 minutos
	Muestra 3	19 $\mu\text{g}/\text{mL}$	60 minutos
	Muestra blanco	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0 minutos

Fuente: Análisis de laboratorio

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

En la tabla 2-3 se muestra el diseño estipulado para la ejecución de los tratamientos de ozonización de las soluciones salinas de miel de abeja al 50%. Se utilizó dos cepas de levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*, las mismas que fueron inoculadas sobre las soluciones salinas de miel de abeja al 50%, cada cepa fue tratada a tres concentraciones diferentes de ozono a un tiempo de 60 min de exposición. El proceso se realizó por triplicado para cada cepa y cada concentración de ozono.



Fotografía 2-3: Proceso de ozonización de solución salina de miel de abeja al 50%

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

3.5 Monitoreo de fermentación, mediante cuantificación de UPC y medición de CO₂.

3.5.1 Análisis microbiológico de las muestras ozonizadas no fermentadas (T=0 h).

Se efectuó un análisis microbiológico cuantitativo a las muestras de solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con levaduras, después del proceso de ozonización directa (T=0 h), es decir muestras sin fermentar. Los inóculos se prepararon y se ajustó la concentración a la escala de 0,5 Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ células por mL), la siembra se realizó a la dilución de 1:1000 (10^{-3}) por triplicado.

3.5.1.1 Análisis de la solución salina de miel de abeja al 50% ozonizada inoculada con *Candida albicans*, muestra sin fermentar (T=0 h).

El recuento de *Candida albicans* después de un tratamiento de ozonización, se realizó con tres réplicas, cada una con tres repeticiones cuyos resultados se encuentran en el Anexo M. Se calculó el promedio de las repeticiones de cada una de las réplicas, y el promedio general de cada tratamiento y de la muestra blanco los cuales se encuentra en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3: Resultados promedios del recuento microbiológico de *Candida albicans*, después de un tratamiento de ozonización en la solución salina de miel de abeja al 50 % y muestra blanco.

Concentración de Ozono	Promedios del recuento microbiológico de <i>Candida albicans</i> (UPC/mL)			
	PROM 1	PROM 2	PROM 3	PROM GENERAL
Muestra blanco (0ppm)	$1,5 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$
19 ppm	$4,7 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$	$4,7 \times 10^4$
59 ppm	7×10^3	$1,3 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$
99 ppm	$5,7 \times 10^4$	$5,3 \times 10^4$	$5,3 \times 10^4$	$5,4 \times 10^4$

Fuente: Análisis de laboratorio

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

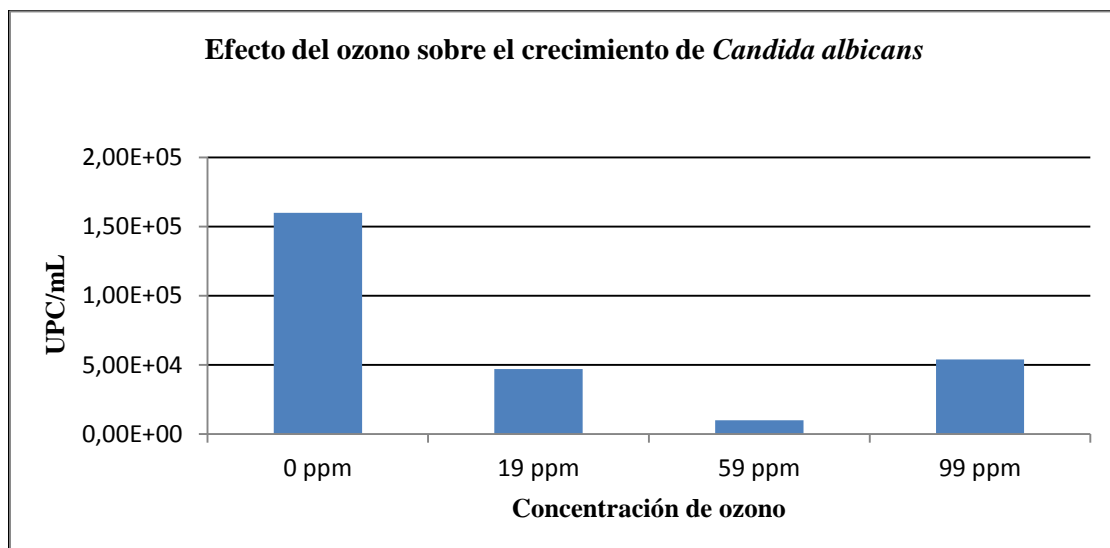


Gráfico 2-3: Efecto letal de tres concentraciones de ozono sobre el crecimiento de *Candida albicans* inoculadas en soluciones salinas de miel de abeja al 50%, sin tiempo de fermentación.

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

De los resultados promedios generales indicados en la tabla 3-3 y representados en el Gráfico 2-3 se puede observar que, en la primera siembra (muestras ozonizadas sin fermentar), el tratamiento del ozonización muestra un efecto letal respecto a la muestra blanco (muestra sin ozonizar), sobre el crecimiento de *Candida albicans*.

Se trató muestras de soluciones de miel de abeja al 50% contaminada con *Candida albicans*, a diferentes concentraciones de ozono. La muestra sin tratamiento de ozono presenta un recuento microbiológico de $1,6 \times 10^5$ /ml, siendo mayor con respecto a las muestras con ozono, esto indica que, la cantidad de azúcar existente en esta solución salina de miel, es tolerable para que las levaduras se reproduzcan y se dé un crecimiento de ellas. Esta particularidad permite detectar el efecto existente del ozono sobre la presencia de las levaduras. Después de una exposición de 60 minutos con 59 ppm de ozono a una muestra de solución salina de miel al 50% contaminada con *Candida albicans* se observa que existe una disminución significativa en el recuento microbiológico ($1,0 \times 10^4$ /ml) de células, mientras que, con concentraciones más bajas y más elevadas no se logra una disminución clara de esta levadura, pero las tres concentraciones muestran una disminución estándar notoria respecto a la muestra que no se aplicó ozono, posiblemente debido al efecto sobre la membrana celular de las levaduras y producción de metabolitos producto del proceso de ozonización.

El comportamiento de *Candida albicans*, es muy reiterativo en el hecho de que se ve afectada a una concentración media de las tres concentraciones aplicadas de ozono, esto se puede explicar en función de la descomposición del ozono a oxígeno, la mayor concentración de ozono provocaría mayor cantidad de oxígeno que estimularía el comportamiento de crecimiento aeróbico de *Candida albicans*, que le es característico. La menor concentración de ozono, provocaría poca cantidad de oxígeno que estimularía el comportamiento anaeróbico. La concentración media (59 ppm de ozono), muestra un efecto considerable sobre el crecimiento *Candida albicans*, esto se interpretaría en el hecho de que hay un proceso de estrés oxidativo muy considerable sobre el microorganismo, de tal forma que, *Candida albicans* tiene un comportamiento no definido, si aeróbico o anaeróbico, esta percepción se fundamenta según lo expresado por Méndez, (2015).

“A dosis y concentración adecuada, el estrés oxidativo producido por el O₃ inducirá una respuesta de adaptación en el organismo con modulación del sistema inmune y potenciación de los sistemas antioxidantes, mediante mecanismos de acción bien descritos. Por otra parte, hay que tener en cuenta que el efecto del O₃ no tiene una relación dosis/respuesta lineal, sino que sigue el concepto de Hormesis: debe alcanzar una dosis suficientemente alta para inducir una respuesta adaptativa, pero no tan alta como para sobrepasar la capacidad de adaptación y ocasionar un efecto dañino” (Méndez, 2015, p.28).

El ozono en el ámbito médico (ozonoterapia), ha ganado más y más terreno, se ha propuesto métodos menos invasivos para su aplicación y lo más importante, no posee efectos secundarios de gran relevancia, el ozono y sus metabolitos actúan atacando a la pared celular y membranas protectoras del microorganismo mediante la peroxidación de sus fosfolípidos, lipoproteínas y polipéptidos que las constituyen y oxidación de las moléculas de N-glucosamida de sus envolturas, y así impide su fusión con la membrana celular, produciendo la ruptura de los ácidos nucleicos de los microorganismos, dando como resultado final su inactivación y destrucción (Hidalgo y Torres, 2013, pp.292-293).

Estudios realizados por Schwartz, A. (2015), sobre patologías de vulvovaginitis, originado por *Candida albicans* muestra que tratamientos con ozono, tiene acción germicida, basado en el transitorio estrés oxidativo, el cual es un efecto mortal para los microorganismos debido a la debilidad de su sistema de defensa antioxidante, por carencia de enzimas tales como la superóxido dismutasa o la catalasa (Schwartz, 2015, p.95).

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE DATOS

Hipótesis

H0: El incremento de la concentración de ozono no tiene efecto letal sobre *Candida albicans* luego de ozonizar una muestra contaminada de solución salina miel al 50%.

H0: C1=C2=C3.

Mediante el test de ANOVA de un factor ejecutado se evidenció que las concentraciones de ozono afecta significativamente a la capacidad de supervivencia de *Candida albicans*, al nivel de significancia $p \leq 0,001$

Según esto la concentración de 59 ppm de ozono aplicada sobre una muestra de solución salina de miel al 50% contaminada con *Candida albicans* y con la metodología propuesta para el proceso de ozonización y análisis microbiológico muestra mayor actividad antimicrobiana, catalogándose como el mejor tratamiento frente a esta levadura. Sin embargo el descenso numérico mostrado en el tratamiento a 59 ppm, amerita una interpretación de tipo biológico particular.

Tukey B ^a	
CONCENTRACIÓN DE OZONO (ppm)	UPC/mL <i>Candida albicans</i>
19	4,67 b
59	1,00 a
99	5,66 c
ANOVA	***
Los valores seguidos con la misma letra, no son significativamente diferentes de acuerdo al test de Tukey a $P < 0,05$.	

3.5.1.2 Análisis de la solución salina de miel de abeja al 50% ozonizada y previamente contaminada con *Saccharomyces cerevisiae*, muestra sin fermentar (T=0 h)

El recuento de *Saccharomyces cerevisiae* después de un tratamiento de ozonización, se realizó con tres réplicas, cada una con tres repeticiones cuyos resultados se encuentran en el Anexo N. Se calculó el promedio de las repeticiones de cada una de las réplicas, y el promedio general de cada tratamiento y muestra blanco los cuales se ilustra en la Tabla 4-3.

Tabla 4-3: Resultados promedios del recuento microbiológico de *Saccharomyces cerevisiae*, tras un tratamiento de ozonización en solución salina de miel de abeja al 50% y muestra blanco.

Concentración de Ozono	Promedios del recuento microbiológico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (UPC/mL)			
	PROM 1	PROM 2	PROM 3	PROM GENERAL
Muestra blanco (0ppm)	1,4x10 ⁵	1,5x10 ⁵	1,7x10 ⁵	1,5x10 ⁵
19 ppm	2,7x10 ⁴	2,7x10 ⁴	3,3x10 ⁴	2,9x10 ⁴
59 ppm	3,0x10 ⁴	3,7x10 ⁴	4,0x10 ⁴	3,6x10 ⁴
99 ppm	2,3x10 ⁴	3,3x10 ⁴	4,0x10 ⁴	3,2x10 ⁴

Fuente: Análisis de laboratorio.

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

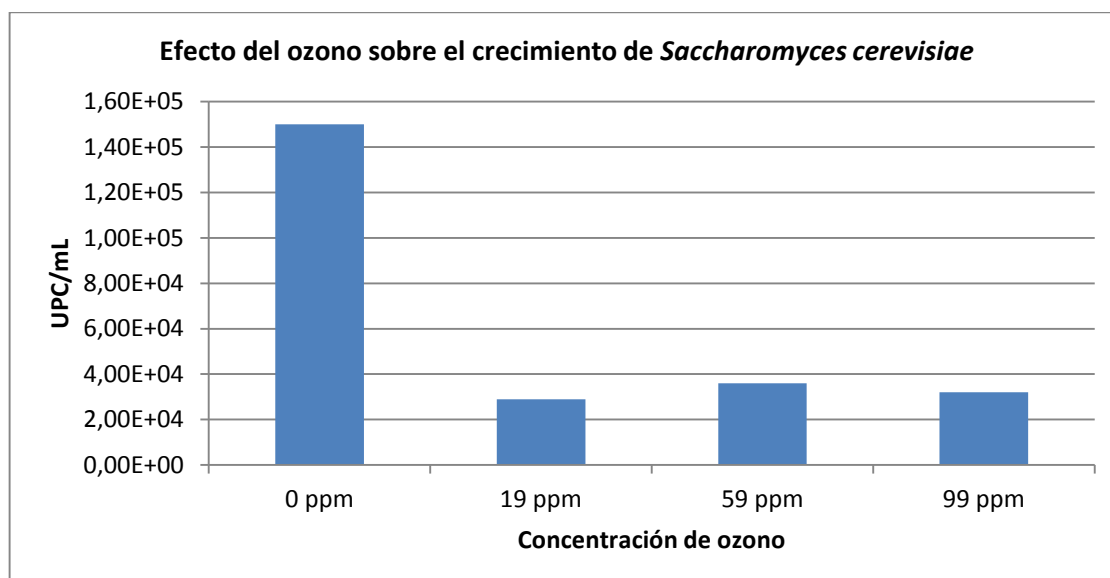


Gráfico 3-3: Efecto letal de tres concentraciones de ozono sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* inoculada en soluciones salinas de miel de abeja al 50% sin tiempo de fermentación.

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

Sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, los datos promedios generales plasmados en la tabla 4-3 y representados en la gráfica 3-3, indican que, el tratamiento de ozonización a tres concentraciones diferentes, tiene un efecto letal (efecto antimicrobiano) similar entre ellas, en comparación a la muestra blanco (muestra sin tratamiento). Según estos se puede concluir, que la concentración letal para *Saccharomyces cerevisiae* no debe ser menor a 19 ppm por 60 minutos, mediante la metodología planteada.

Saccharomyces cerevisiae responden a proceso de estrés oxidativo mediante una serie de respuestas celulares que aseguran la supervivencia de la célula tras la exposición a estas especies. Una de ellas, es la activación de los factores de transcripción Yap1 y Skn7, se activan de forma transitoria generando una respuesta transcripcional que permite a la célula adaptarse a esta situación cambiante (Bets, 2014, p.4).

Según Folch-mallol et al.,(2004) *Saccharomyces cerevisiae*, presenta un mecanismo de adaptación ante los diferentes proceso de estrés que se pudiese presentar, sin embargo, las condiciones adversas a las que se enfrenta esta levadura afectan principalmente a las estructuras celulares (membranas plasmáticas) y a las diferentes macromoléculas, especialmente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, las cuales sufren modificaciones estructurales que dañan su función (Folch et al., 2004, pp.32-33).

ANÁLISIS DEL TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE DATOS

Hipótesis

H0: El incremento de la concentración de ozono no elimina *Saccharomyces cerevisiae* luego de ozonizar una muestra contaminada de miel al 50%.

H0: T1=T2=T3.

Mediante el test de ANOVA de un factor se evidenció que las concentraciones de ozono afecta significativamente a la capacidad de supervivencia de *Saccharomyces cerevisiae* al nivel de significancia $p \leq 0,05$. Sustentado en el resultado estadístico, se podría concluir que la concentración más adecuada para bloquear al crecimiento de levaduras, es de 19 ppm de ozono por 60 minutos, según la metodología seguida.

Tukey B ^a	
CONCENTRACIÓN DE OZONO (ppm)	UFC/mL <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
19	2,89 a
59	3,22 a
99	3,56 a
ANOVA	*
Los valores seguidos con la misma letra, no son significativamente diferentes de acuerdo al test de Tukey a $P > 0,05$.	

3.5.2 Proceso de fermentación (horas) de las muestras ozonizadas en Jeringuillas.

Las muestras de solución salina de miel de abeja al 50% en jeringuillas tratadas con ozono y muestra blanco, se procedió a introducir a una incubadora a una temperatura de 29°C, para evidenciar el proceso de fermentación progresivo, mediante el desplazamiento del émbolo, desde 28 mL de volumen hasta los 60 mL, volumen de la jeringuilla. Datos que se representaran mediante dos gráficos:

- Gráfico concentración de ozono vs tiempo
- Gráfico de volumen de CO₂ desplazado vs tiempo de recorrido.

3.5.2.1 Análisis del monitoreo de fermentación de la solución salina de miel de abeja al 50% contaminada con *Candida albicans* en jeringuillas.

El análisis del monitoreo de fermentación sobre la muestra de solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con *Candida albicans* tras un tratamiento de ozonización se realizó con tres repeticiones cuyos resultados que se encuentran en el Anexo O. Se calculó el promedio de las repeticiones y el promedio general, los cuales se ilustra en la Tabla 5-3.

Tabla 5-3: Tiempos promedios de fermentación de solución salina de miel de abeja al 50% contaminada con *Candida albicans*, luego de la exposición de 60 minutos al tratamiento de ozonización.

TRATAMIENTOS Concentración de Ozono	Condiciones del monitoreo: jeringuilla 60ml, 28 ml de sol. de miel al 50% contaminada, longitud de desplazamiento 32 ml, T 29°C.			
	PROM 1 (Horas)	PROM 2 (Horas)	PROM 3 (Horas)	PROM GENERAL (Horas)
Muestra blanco (0ppm)	115,09	115,3	113,26	114,55
19 ppm	99,87	99,85	98,06	99,26
59 ppm	150,73	149,97	149,84	150,18
99 ppm	118,34	117,91	116,49	117,58

Fuente: Análisis de laboratorio

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

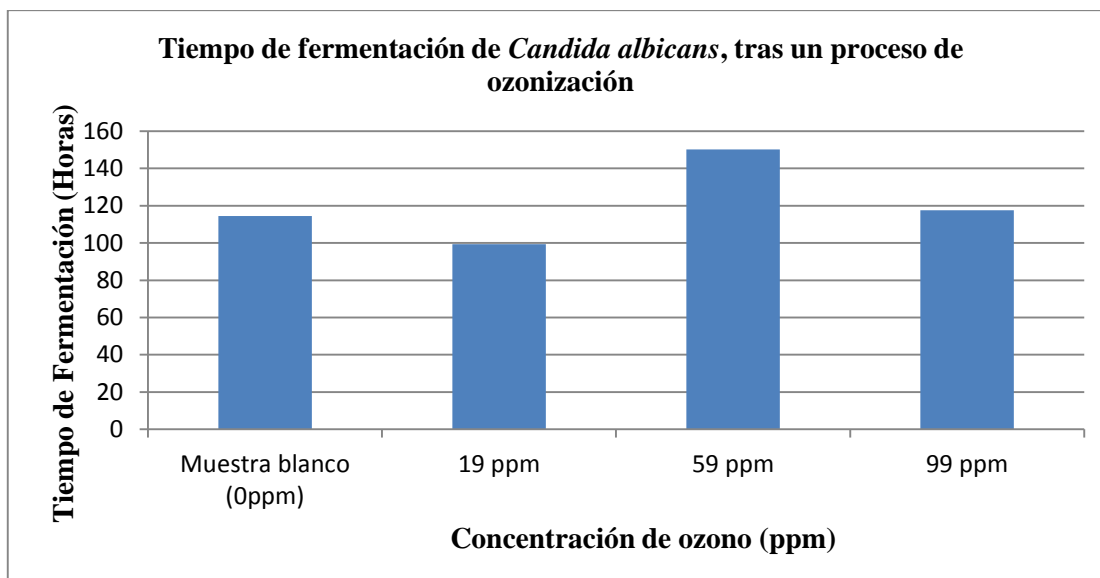


Gráfico 4-3: Tiempo de fermentación de soluciones salinas de miel de abeja al 50% inoculada con *Candida albicans*, tras el proceso de ozonización.

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

El tratamiento ejecutado con el valor medio de concentración de ozono (59 ppm), tiene un tiempo de fermentación más prolongado, mientras que las concentraciones mayor y menor a 59 ppm, generan tiempo de fermentación más cortos. Esto indicaría que a 59 ppm, existe menor número de células afectadas por el ozono y su proceso de fermentación será lento.

En este contexto, el mejor tratamiento de ozonización para inhibir la fermentación alcohólica es usar 59 ppm de ozono por 60 minutos, según la metodología propuesta en esta investigación. El gráfico no muestra proporcionalidad, como podría pensarse, comportamiento similar al observado en el análisis microbiológico de UPC de las muestras ozonizadas antes de fermentar del mismo. Esto se explicaría de manera similar a lo argumentando en el análisis microbiológico de muestras ozonizadas antes de fermentar, es decir *Candida albicans* se comportaría como aeróbico o anaeróbico.

El tiempo de desplazamiento del émbolo tendría un efecto sumativo la producción de CO₂, sería la cantidad de oxígeno, producto de la descomposición del ozono, pues también intervendría en el desplazamiento del émbolo, es decir, una vez ejecutado la acción, el ozono se descompone y genera un cierta cantidad de oxígeno y al estar en un ambiente totalmente hermético (jeringuilla sellada), la presión que existiría, produciría el desplazamiento del émbolo.

Explicación que también se sustenta en el análisis de las curvas de fermentación (volumen de CO₂ vs tiempo).

- Gráfico de fermentación por *Candida albicans* (volumen de CO₂ desplazado vs tiempo recorrido)

La tabla 5-3 Contiene promedios generales de tiempo promedios de fermentación de tres tratamiento por triplicado, datos que se encuentra en anexos, de los cuales se transcribe a continuación en el comportamiento gráfico (Volumen de desplazamiento por CO₂ vs tiempo de fermentación (horas) para cada concentración de ozono y blanco.

En este monitoreo se observó un comportamiento particular, un tiempo muy largo donde no hay fermentación (80-120 horas), después de este tiempo se evidencia una fermentación progresiva (coincide con una fase log de continuo crecimiento potencial), particularidad que sugiere pensar en un comportamiento de tipo fungistática, pues este hecho fue reiterativo en las repeticiones para este microorganismo.

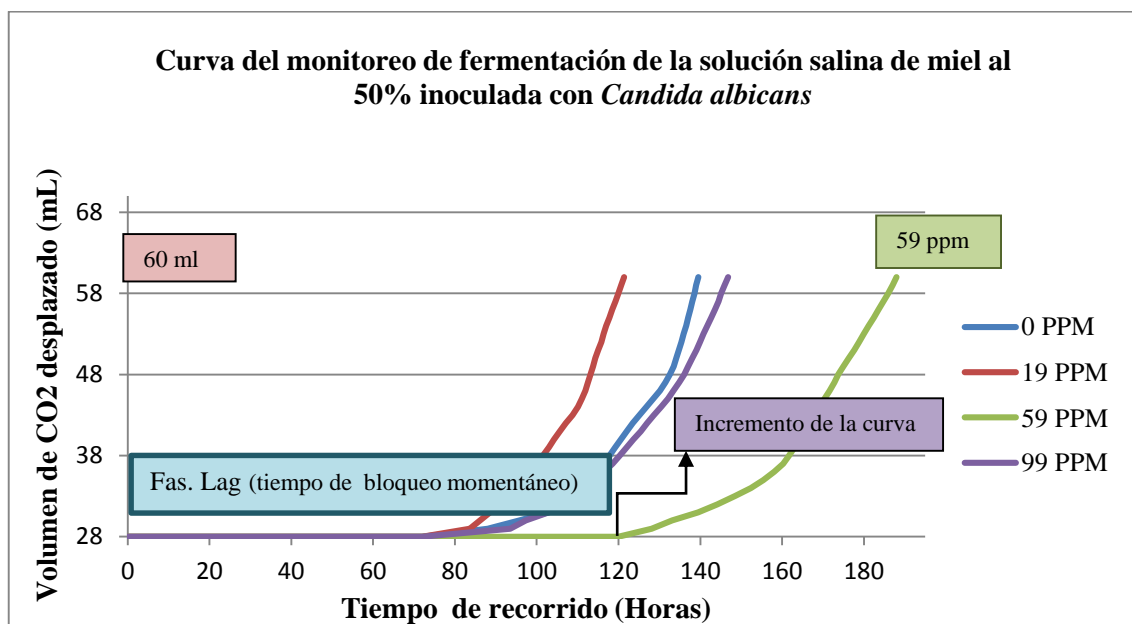


Gráfico 5-3: Curva del monitoreo del proceso de fermentación de *Candida albicans* inoculada en solución salina de miel de abeja al 50%.

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

Analizando la curva del monitoreo del proceso de fermentación de *Candida albicans* inoculada en una solución salina de miel de abeja al 50% tras un proceso de ozonización presentando en la gráfico 5-3, se evidencia que existe un tiempo de bloqueo momentáneo de fermentación (Fas. Lag), las células pueden llegar a adaptarse al nuevo medio expuesto.

Una vez superado esta fase, se puede observar un incremento de menor a mayor intensidad de la curva de fermentación, dependientemente de las concentraciones de ozono aplicadas. En el cual se indicaría, que las células han logrado adaptarse al medio, crecer y multiplicarse.

Ante esto se indica que, a la concentración de 59 ppm se observa un tiempo de más prolongado de retraso del proceso de fermentación (fas lag; 120 horas) en comparación a las otras concentraciones aplicadas, concluyendo que a 59 ppm por 60 minutos de exposición, el ozono logra inhibir por más tiempo a estas células y por el efecto reiterativo del incremento de la curva de fermentación de las muestras tratadas, después de un tiempo largo de inexistencia de fermentación, sugiere de un comportamiento fungistática del ozono ante *Candida albicans*.

3.5.2.2 *Análisis del monitoreo de fermentación de la solución salina de miel de abeja al 50% contaminada con Saccharomyces cerevisiae en jeringuillas.*

El análisis del proceso de fermentación sobre una muestra de solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con *Saccharomyces cerevisiae* tras un tratamiento de ozonización, se realizó con tres repeticiones cuyos resultados se encuentran en el Anexo P. Se calculó el promedio de las repeticiones y el promedio general de cada tratamiento y muestra blanco los cuales se ilustra en la Tabla 6-3.

Tabla 6-3: Resultados promedios del proceso de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae*, tras un proceso de ozonización a una solución salina de miel de abeja al 50% y muestra blanco.

TRATAMIENTOS Concentración de Ozono	Condiciones del monitoreo: jeringuilla 60ml, 28 ml de sol. de miel al 50% contaminada, longitud de desplazamiento 32 ml, T 29°C.			
	PROM 1 (Horas)	PROM 2 (Horas)	PROM 3 (Horas)	PROM GENERAL (Horas)
Muestra blanco (0ppm)	70,53	71,92	72,86	71,77
19 ppm	137,61	137,16	135,13	136,63
59 ppm	136,71	138,16	140,45	138,44
99 ppm	139,61	133,46	137,57	136,88

Fuente: Análisis de laboratorio.

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

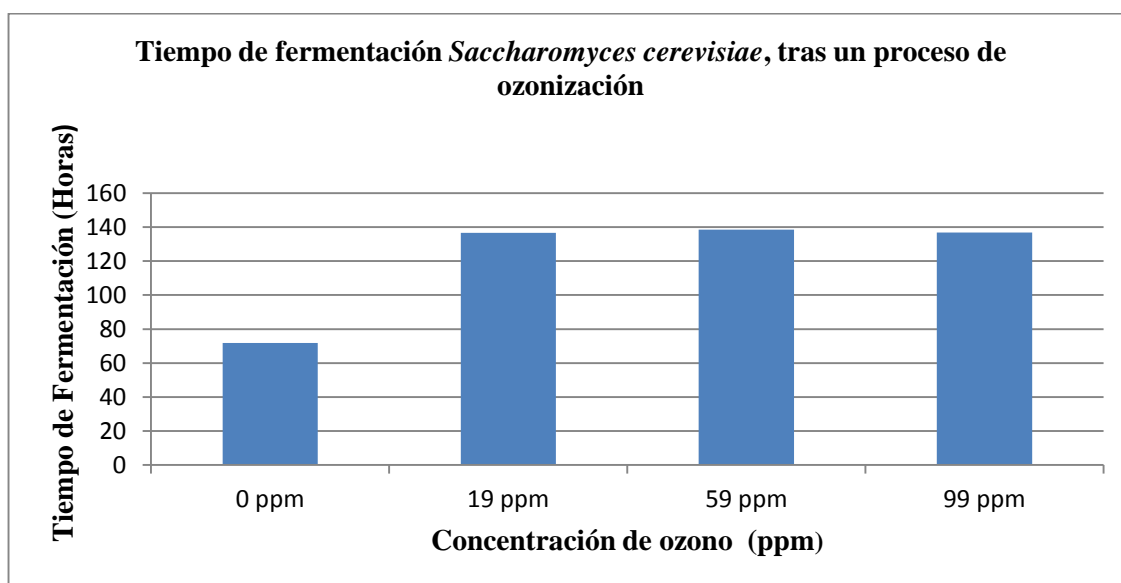


Gráfico 6-3: Tiempo de fermentación de la solución salina de miel de abeja al 50% contaminada con *Saccharomyces cerevisiae*, tratadas a diferentes concentraciones de ozono

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

Los tiempos promedios de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* tras un tratamiento de ozonización a tres concentraciones diferentes, son similares, pero diferente en comparación a la muestra blanco (muestra sin tratamiento). El gráfico muestra proporcionalidad, comportamiento cercano al observado en el análisis microbiológico de UPF de las muestras ozonizadas antes de fermentar. A la producción de CO₂ generado en el proceso de fermentación, se sumaría la cantidad de oxígeno, producto de la descomposición del ozono, esto supondría una presión resultante de estos dos gases en el desplazamiento del émbolo. El desplazamiento del émbolo en

la muestra blanco, sería resultado exclusivo de la fermentación anaeróbica de *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae presenta un metabolismo anaerobio facultativo, esta levadura presenta una fermentación rápida, pero no existe un aumento en la biomasa (Souza, Oliveira and Severo, 2013). Por lo expuesto se puede mencionar, que la velocidad de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* no se deba a aumento propio en su biomasa. A través de lo expuesto, se puede mencionar que, para producir una inhibición en la fermentación alcohólica de *Saccharomyces cerevisiae*, la concentración de ozono a utilizar no debe ser menor a 19 ppm de ozono por 60 minutos según la metodología propuesta. Explicación que también se sustenta en el análisis de las curvas de fermentación (volumen de CO₂ vs tiempo).

- Gráfico de fermentación por *Saccharomyces cerevisiae* (Volumen de CO₂ desplazado vs tiempo recorrido)

La tabla 6-3: Contiene promedios generales de tiempo promedios de fermentación de tres tratamiento por triplicado, datos que se encuentra en anexos, de los cuales se transcribe a continuación en el gráfico (Volumen de desplazamiento por CO₂ vs tiempo de fermentación (horas) para cada concentración de ozono y blanco. En este monitoreo se observó un comportamiento particular, un tiempo muy largo donde no hay fermentación (110 horas), después de este tiempo se evidencia un fermentación progresiva, particularidad que sugiere un comportamiento de tipo fungistática, pues este hecho fue reiterativo en las repeticiones para este microorganismo.

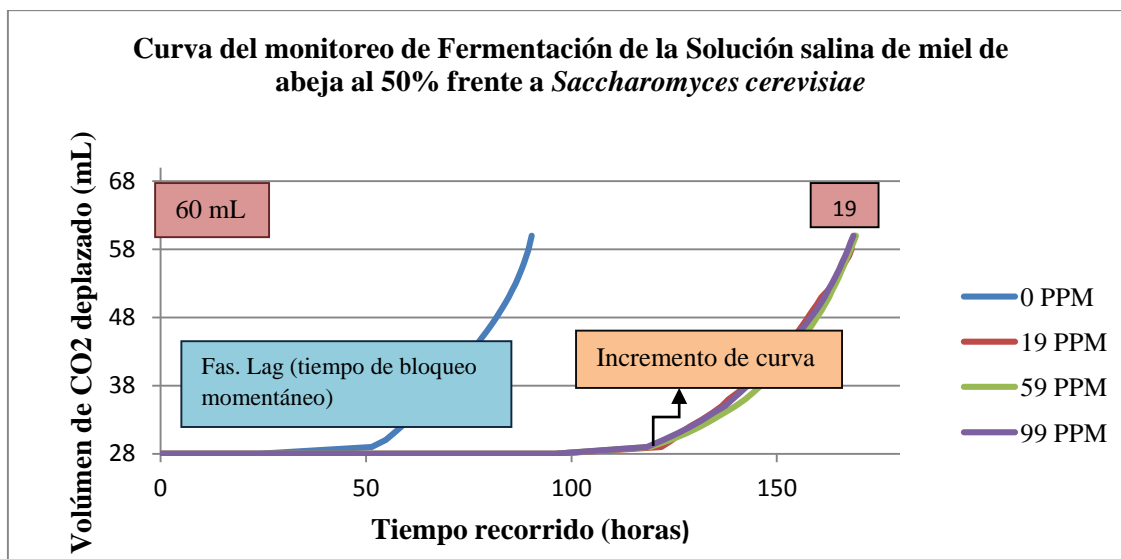


Gráfico 7-3: Curva del monitoreo del proceso de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae*, inoculada en solución salina de miel de abeja al 50%.

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

Analizando la curva del monitoreo del proceso de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae*, inoculada en una solución salina de miel de abeja al 50% tras un proceso de ozonización presentando en la gráfico 7-3, se evidencia que existe un tiempo de bloqueo momentáneo de fermentación (Fas. lag), las células pueden llegar a adaptarse al nuevo medio expuesto. Una vez superado esta fase, se puede observar un incremento de menor a mayor intensidad de la curva de fermentación, dependientemente de las concentraciones de ozono aplicadas. En el cual se indicaría, que las células han logrado adaptarse al medio, crecer y multiplicarse.

Ante esto se menciona que, a una concentración de 19 ppm presenta un tiempo más prolongado de retraso de fermentación (fas lag; 110 horas) en comparación a las otras concentraciones aplicadas, concluyendo que la concentración letal para *Saccharomyces cerevisiae* no debe ser menor a 19 ppm por 60 minutos, mediante la metodología planteada y sugiere un comportamiento fungistática del ozono ante esta célula, por el efecto reiterativo del incremento de la curva de fermentación.

Sin embargo el desplazamiento del émbolo de las jeringuillas luego del tiempo de bloqueo merece ser explicado con pruebas confirmatorias, que se mencionan a continuación y puntualizaran si este comportamiento se debe a fermentación u oxígeno generado por descomposición de ozono.

3.5.3 Pruebas confirmatorias alternativas anexas del monitoreo de fermentación de las muestras ozonizadas en Jeringuillas.

Luego del tiempo de bloqueo momentáneo de la fermentación existe un desplazamiento del émbolo, este comportamiento direccionó a dilucidar la causa del mismo, realizando una valoración de oxígeno molecular por degradación de ozono y un análisis microbiológico para valorar el crecimiento de levaduras que explique su posible actividad relacionado a la fermentación alcohólica.

3.5.3.1 Valoración de oxígeno molecular por degradación de ozono.



Fotografía 3-3: Reducción de azul de metileno con glucosa en medio alcalino

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019



Fotografía 4-3: Expulsión de oxígeno de las jeringuillas fermentadas.

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019



Fotografía 5-3: Coloración azul pálido, (azul de metileno oxidado), provocada por el oxígeno producto de la degradación del ozono.

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

Una vez terminado la fermentación, se procedió a analizar el gas generado durante este proceso, a través de una prueba experimental, basado en el cambio de color, indicando la presencia o ausencia de oxígeno.

Según Monter (2013), el ozono se descompone en oxígeno molecular, con valores de vida media dependiente del sistema en el estado gaseoso (tiempo medio 55 min en una jeringuillas desechable

de 50 mL) o incluso en un medio acuoso, aunque con tiempo de vida media considerablemente retrasadas (tiempo medio=10 horas en agua bidestilada a 20°C) (Monter, 2013, p.100). A través del cambio del color de transparente a azul observadas en las fotos, se puede mencionar que el gas existente en las muestras de jeringuillas fermentadas es oxígeno. Al ser una prueba cualitativa, no se puede hablar de porcentaje de oxígeno existente, pero la reacción desarrollada indica la existencia de oxígeno como responsable del desplazamiento del émbolo junto con la cantidad de CO₂ producto de la fermentación desarrollada por las levaduras que ha alcanzado la adaptación al nuevo sustrato.

3.5.3.2 Análisis microbiológico para valorar el crecimiento de levaduras de las muestras ozonizadas fermentadas.

Se procedió a analizar las muestras de las jeringuillas una vez terminado el proceso de monitorización de la fermentación, con el fin de analizar un posible aumento en la biomasa de estas células respecto a las que existían en las muestras sin fermentar (T=0 h), que a su vez deberían estar en menor cantidad que las inoculadas. También se estableció el porcentaje de inhibición para cada cepa de levadura estudiada por el ozono. El análisis microbiológico se realizó individualmente con los dos microorganismos utilizados, que a continuación se detalla.

*3.5.3.3 Análisis microbiológico de la solución salina de miel de abeja al 50% contaminada con *Candida albicans**

El análisis microbiológico de *Candida albicans* de muestras fermentadas, después de un tratamiento de ozonización, se realizó con tres réplicas, cada una con tres repeticiones cuyos resultados se encuentran en el Anexo Q. Se calculó el promedio de las repeticiones de cada una de las réplicas, y el promedio general de cada tratamiento y muestra blanco los cuales se recogen en la Tabla 7-3.

Tabla 7-3: Resultados promedios del recuento microbiológico de *Candida albicans* (UPC/mL) de muestras fermentadas.

Concentración de Ozono	Promedios del recuento microbiológico de <i>Candida albicans</i> (UPC/mL), muestra fermentada			
	PROM 1	PROM 2	PROM 3	PROM GENERAL
Muestra blanco (0ppm)	1,6x10 ⁵	1,7x10 ⁵	1,7x10 ⁵	1,7x10 ⁵
19 ppm	1,0x10 ⁴	1,3x10 ⁴	2,3x10 ⁴	1,5x10 ⁴
59 ppm	3x10 ³	3x10 ³	7x10 ³	4,3x10 ³
99 ppm	7x10 ³	1,7x10 ⁴	1,0x10 ⁴	1,1x10 ⁴

Fuente: Análisis de laboratorio

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

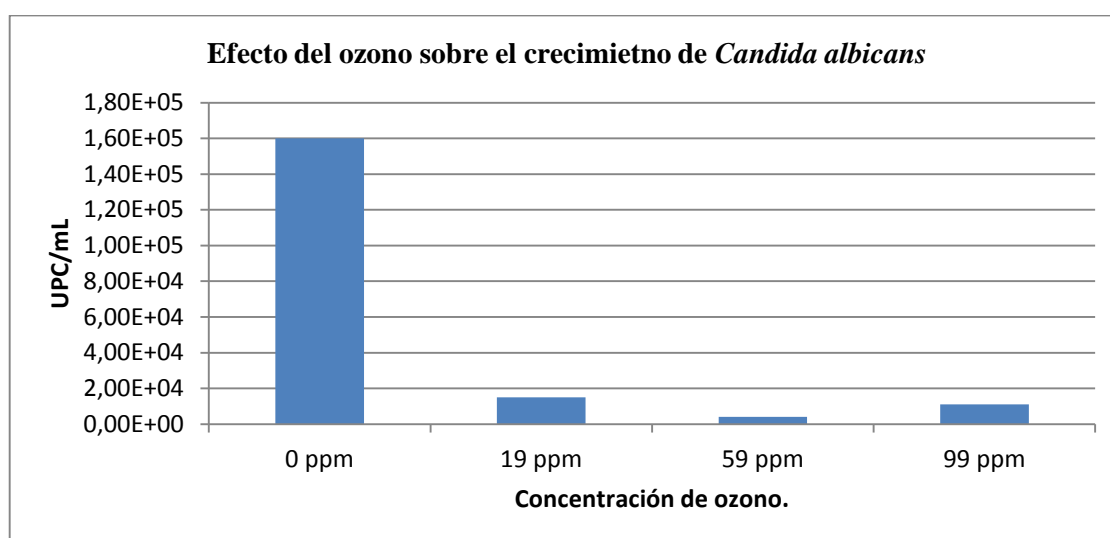


Gráfico 8-3: Recuento microbiológico de *Candida albicans* en muestras de soluciones salinas de miel de abeja al 50%, una vez terminado el proceso de fermentación.

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

El resultado del análisis microbiológico de tres concentraciones de ozono muestra una disminución notable de UPC de *Candida albicans*, respecto al blanco, lo cual se asocia con la actividad de las levaduras viables. Por tanto, para la valoración del crecimiento de las levaduras y el porcentaje de inhibición, en la prueba confirmatoria se centró la discusión de los resultados únicamente a la concentración de 59 ppm de ozono.

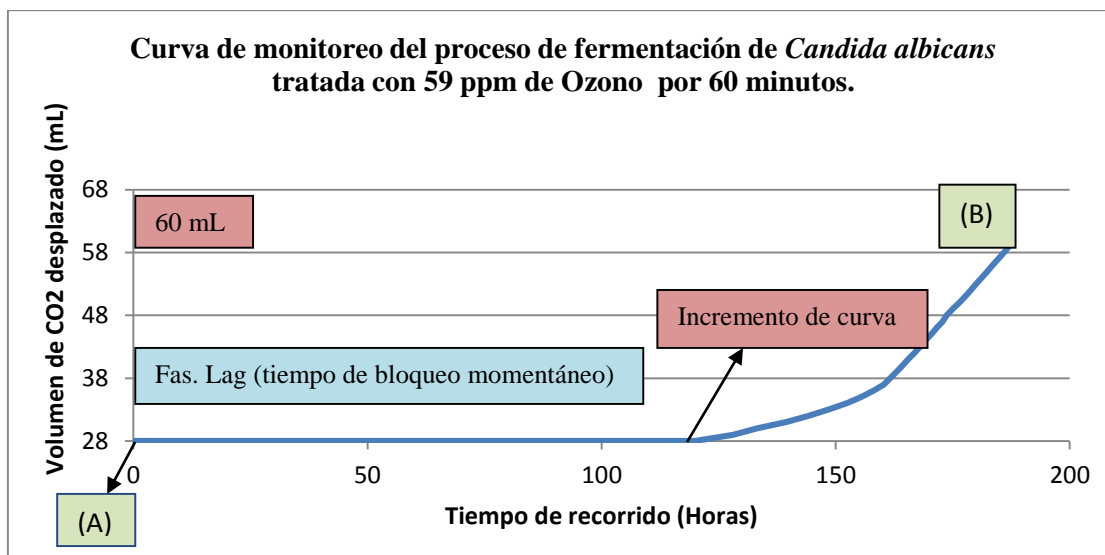


Gráfico 9-3: Curva de monitoreo del proceso de fermentación de solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con *Candida albicans*, tratado con 59 ppm de ozono por 60 minutos.

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

En la gráfica 9-3 correspondiente al tratamiento de ozonización con una concentración de 59 ppm se puede observar dos momentos: (A) T=0 h inicio de tiempo de fermentación y (B) tiempo de finalización de fermentación (60 mL). El análisis microbiológico muestra que en el punto de finalización de la fermentación (B), existen $4,3 \times 10^3$ /mL *Candida albicans*, valor inferior respecto al inicio de fermentación luego de la ozonización (T=0 h) presentando $1,0 \times 10^4$ /mL de *Candida albicans* (Tabla 3-3), esta disminución puede responder a una eliminación parcial de levaduras por efecto del ozono residual y probablemente el efecto de la miel disuelta (periodo de tiempo de bloqueo momentáneo de fermentación). La reactivación de la fermentación observada en la curva correspondería a la supervivencia y adaptación que pueden haber alcanzado cierto número de levaduras.

Por lo expuesto se puede indicar que el ozono realiza un primer efecto antimicrobiano, tras el proceso de ozonización, a través del daño de las membranas de las células y generación de oxígeno y moléculas como H_2O_2 , sinérgicamente puede existir un segundo efecto antimicrobiano, procedente de la miel.

Porcentaje de inhibición

$$\% \text{ inhibición} = \frac{R. \text{ inicial} - R. \text{ final}}{R. \text{ inicial}} \times 100$$

$$\% \text{ inhibición} = \frac{1,7 \times 10^5 - 7,1 \times 10^3}{1,7 \times 10^5} \times 100$$

$$\% \text{ inhibición} = 95,6 \%$$

A una concentración de 59 ppm de ozono por 60 minutos de exposición, presentó un porcentaje de inhibición del 95,6% de la población de *C. albicans*.

El escenario observado en estos resultados permite apreciar que el ozono muestra una actividad fungistática donde es capaz de inhibir el crecimiento de levaduras o matarlas parcialmente.

3.5.3.4 Análisis microbiológico de la solución salina de miel de abeja al 50% contaminada con *Saccharomyces cerevisiae*

El análisis microbiológico de *Saccharomyces cerevisiae* de muestras fermentadas, después de un tratamiento de ozonización, se realizó con tres réplicas, cada una con tres repeticiones cuyos resultados se encuentran en el Anexo R. Se calculó el promedio de las repeticiones de cada una de las réplicas, y el promedio general de cada tratamiento y muestra blanco los cuales se encuentran en la Tabla 8-3.

Tabla 8-3: Resultados promedios del recuento microbiológico de *Saccharomyces cerevisiae* (UPC/ml) de muestras fermentadas.

Concentración de Ozono	Promedios del recuento microbiológico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (UPC/mL), muestra fermentada			
	PROM 1	PROM 2	PROM 3	PROM GENERAL
Muestra blanco (0ppm)	1,5x10 ⁵	1,6x10 ⁵	1,6x10 ⁵	1,6x10 ⁵
19 ppm	7x10 ³	3x10 ³	7x10 ³	5,7x10 ³
59 ppm	3x10 ³	1,0x10 ⁴	1,3x10 ⁴	8,7x10 ⁴
99 ppm	7x10 ³	7x10 ³	1,0x10 ⁴	8,0x10 ⁴

Fuente: Análisis de laboratorio.

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

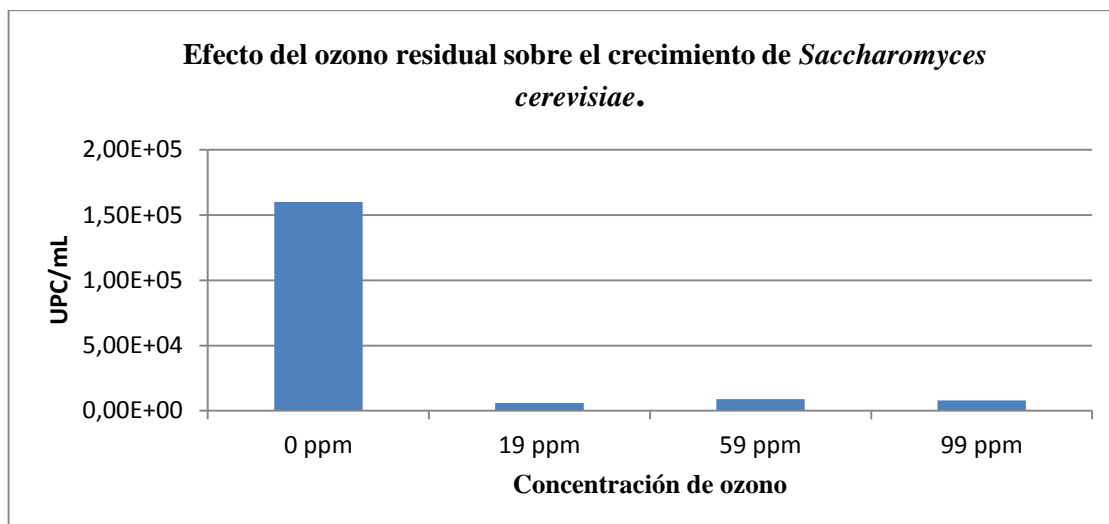


Gráfico 10-3: Recuento microbiológico de *Saccharomyces cerevisiae* en muestras de soluciones salinas de miel de abeja al 50%, una vez terminado el proceso de fermentación.

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

El resultado del recuento microbiológico de *Saccharomyces cerevisiae* expuesto a tres concentraciones de ozono muestra una disminución notable de UPC de esta levadura, respecto al blanco, lo cual indicaría existencia de levaduras. Por tanto para la valoración del crecimiento de las levaduras y el porcentaje de inhibición en la prueba confirmatoria, los resultados de discusión se centraran únicamente a la concentración de 19 ppm de ozono.

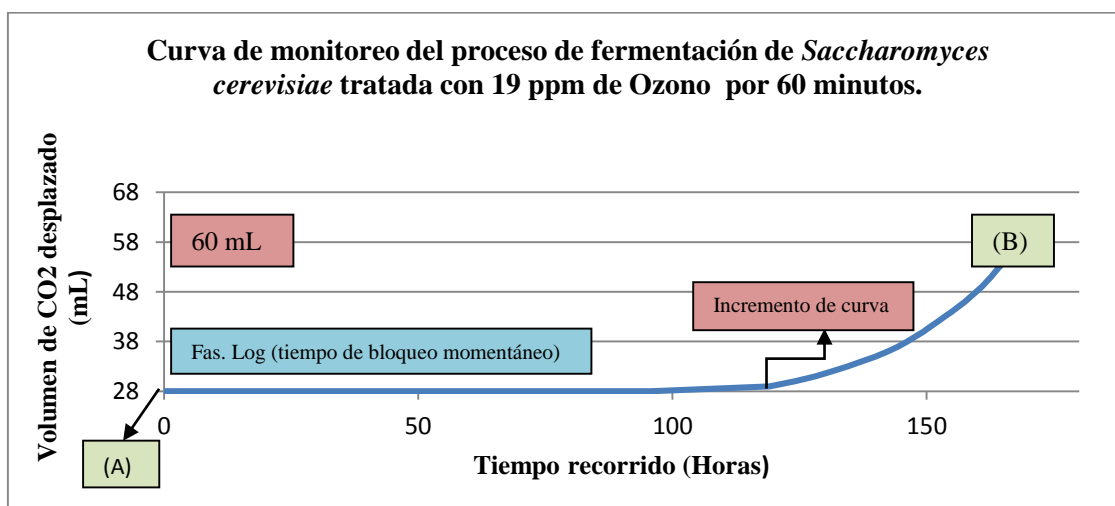


Gráfico 11-3: Curva de monitoreo del proceso de fermentación de solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con *Saccharomyces cerevisiae* tratado con 19 ppm de ozono por 60 minutos.

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

En el gráfico 11-3 correspondiente al tratamiento de ozonización con una concentración de 19 ppm se puede observar dos momentos: (A) T=0 h inicio de tiempo de fermentación y (B) tiempo de finalización de fermentación (60 mL).

El análisis microbiológico muestra que en el punto de finalización de la fermentación (B), existen $5,7 \times 10^3$ /mL de *Saccharomyces cerevisiae*, valor inferior respecto al inicio de la fermentación luego de la ozonización (T=0 h) en donde contiene $2,9 \times 10^4$ /mL de *Saccharomyces cerevisiae* a 19 ppm de ozono (Tabla 4-3), esta disminución puede responder a una eliminación parcial de levaduras por efecto del ozono residual y probablemente el efecto de la miel disuelta (periodo de tiempo de bloqueo momentáneo de fermentación). La reactivación de la fermentación observada en la curva correspondería a la supervivencia y adaptación que pueden haber alcanzado cierto número de levaduras.

Por lo expuesto se puede indicar que el ozono realiza un primer efecto antimicrobiano, tras el proceso de ozonización, a través del daño de las membranas a las células y generación de oxígeno y moléculas como H_2O_2 , sinérgicamente puede existir un segundo efecto antimicrobiano, procedente de la miel.

Porcentaje de inhibición

$$\% \text{ inhibición} = \frac{R. \text{ inicial} - R. \text{ final}}{R. \text{ inicial}} \times 100$$

$$\% \text{ inhibición} = \frac{1,6 \times 10^5 - 1,7 \times 10^4}{1,6 \times 10^5} \times 100$$

$$\% \text{ inhibición} = 88,8\%$$

A la concentración de 19 ppm de ozono por 60 minutos de exposición, presentó un porcentaje de inhibición del 88,8% de población de *S. cerevisiae*

A través de los resultados obtenidos se puede apreciar que el ozono muestra actividad fungistática al inhibir el crecimiento de las levaduras sin llegar a destruir toda su población.

3.5.4 Socialización a ASOPROACH

La socialización se realizó en el centro de Bioenergía Molecular, ubicada en La Dolorosa-Riobamba, el día 20 de diciembre del 2018, con presencia de Doctor Eduardo Fonseca, terapeuta y demás miembros de ASOPROACH. Los respectivos trámites se adjunta en los Anexos: AVAL para la socialización ANEXO S y Certificado de la actividad realizada, ANEXO T.

CONCLUSIONES

- La concentración de miel de abeja no letal para levaduras fue del 50% en solución salina, este dato permite excluir el efecto osmótico como principal factor de control poblacional de las levaduras.
- El desarrollo del trabajo experimental lleva a diseñar un dispositivo “home made” para tratamientos de ozonización de la solución salina de miel al 50%, constituido de un embudo de separación de 100 mL acoplado adecuadamente a un juego de mangueras y al procedimiento planteado para garantizar una ozonización homogénea de la muestra.
- El proceso de ozonización desarrollado, muestra que la actividad fermentativa “*in vitro*” de *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* se detiene durante un tiempo prolongado definiendo que, el ozono tiene un efecto fungistática a una concentración de 59 ppm y 19 ppm por 60 minutos respetivamente. *Candida albicans* inicia el proceso de fermentación después de 120 horas de incubación, *Saccharomyces cerevisiae* inicia después de 110 horas de incubación.
- El ozono como agente de control fúngico es más efectivo frente a *Candida albicans* (95,6% inhibición) que a *Saccharomyces cerevisiae* (88,8% inhibición).
- Experimentalmente el desplazamiento del émbolo en las jeringuillas de las soluciones salinas de miel de abeja al 50% inoculada con *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* respectivamente, se debe a la presión ejercida del oxígeno producto de la descomposición del ozono y al CO₂ producto de la fermentación alcohólica de las levaduras sobrevivientes y adaptadas al medio.
- La ozonización de soluciones salinas de miel de abeja puede ser una alternativa de tipo profiláctico en aplicaciones pertinentes.

RECOMENDACIONES

- Realizar el diseño a escala de un equipo de ozonización en base a los resultados del equipo sugerido en esta investigación.
- Se recomienda realizar un análisis de la solución salina de miel de abeja al 50% antes y después del proceso de ozonización, evaluando sus propiedades nutritivas y medicinales.
- Se sugiere utilizar equipos de protección a nivel respiratorios al tratar con ozono por largos periodo de tiempo de exposición.

BIBLIOGRAFÍA

- Ali, A., et al.** "Effect of ozone pre-conditioning on quality and antioxidant capacity of papaya fruit during ambient storage". *Food Chemistry* [en línea], 2014, vol. 142, pp. 20-21. [Consulta: 15 septiembre 2018]. ISSN 1873-7072. DOI 10.1016/j.foodchem.2013.07.039. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.039>.
- Aloisi, P.V. y Ruppel, S.**"Propiedades bioactivas y nutricionales del polen apícola de la provincia del Chubut , Argentina". *Ria* [en línea], 2014, vol. 40, no. 3, pp. 297. [Consulta: 17 septiembre 2018]. ISSN 1669-2314. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ria/v40n3/v40n3a13.pdf>.
- Alonso, A.L.** *Métodos Clásicos de Análisis Microbiológicos. Guión de Prácticas* [en línea]. [Consulta: 18 septiembre 2018]. Disponible en: https://alojamientos.uva.es/guia_docente/uploads/2013/370/51343/1/Documento1.pdf.
- Altman, N.** *Terapias de oxígeno: Para una óptima salud y vitalidad* [en línea]. Ilustrada. San Andrés: s.n. ISBN 0892814721, 9780892814725, 1996. [Consulta: 18 septiembre 2018]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=AyO__CpcssgC&pg=PA42&dq=El+ozono+es+la+forma+elemental+de+oxígeno+++que+se+encuentra+++naturalmente+en+la+atmosfera+de+la+tierra.+Se+crea+en+la+naturaleza,+cuando+la+energía+ultravioleta+ocasiona+que+los+átomos+de+oxigen.
- ARCOS FARFÁN, LISSETH JULIANA.** ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DE LA MIEL DE ABEJA CLASE II [en línea]. (tesis). Universidad Técnica de Machala, Ecuador. 2016. p. 10. [Consulta: 2018-09-19]. Disponible en: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/7713/1/arcos.pdf>.
- AREVALO SAENZ, SYUMEY TERESA.** Agua En Los Alimentos [en línea]. (tesis).Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, Perú. 2017. pp. 12-13. [Consulta: 2018-09-19]. Disponible en: http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/5052/Syumey_Tesis_Titulo_2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Baird, C.,** *Química ambiental* [en línea]. 2001, Ilustrada. España: Reverte, 2001. s.n. ISBN 842917902X, 9788429179026. [Consulta: 2018-09-19]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=bgUaHUqGPYIC&pg=PA35&dq=Formación+no+>

catalítica+del+ozono&hl=es-

419&sa=X&ved=0ahUKEwiknub5xvDeAhVCo1kKHWsdDYEQ6AEILTAB#v=onepage
&q=Formación no catalítica del ozono&f

Becerra, J.D., et al. "Efecto antibacteriano de la miel de abeja en diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus*". *Revista Científica Ciencia Médica* [en línea], 2016, vol. 19, no. 2, pp. 38-39. [Consulta: 2018-09-19]. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/pdf/4260/426049510007.pdf>.

BETS PLACENCIA, CAROLINA. Optimización de la detección de daños oxidativos en la célula viva y en tiempo real [en línea]. (tesis). Universitat Politècnica de València, Valencia, España. 2014. p. 4. [Consulta: 2018-09-20]. Disponible en:
[https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/46439/Trabajo Final de Grado Carolina Bets Plasencia.pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/46439/Trabajo%20Final%20de%20Grado%20Carolina%20Bets%20Plasencia.pdf?sequence=1).

BUITRAGO ESTRADA, JHOANNA CAROLINA y TENJO CAMACHO, DOLLY GISELA. Obtención de un sustrato fermentable de origen vegetal y su evaluación con células libres de *Saccharomyces cerevisiae* [en línea]. (tesis). Pontificia Universidad Javeriana. 2007. pp.8-12. [Consulta: 2018-09-20]. Disponible en:
<https://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis285.pdf>.

Cámbara, R.L. *Ozonoterapia* [en línea]. ilustrada. Cuba: LibrosEnRed.ISBN 1629153060, 9781629153063. 2017. [Consulta:20 septiembre 2018]. Disponible en:
[https://books.google.com.ec/books?id=HIRHDwAAQBAJ&pg=PA66&dq=FORMAS+DE+ACCIÓN+DEL+OZONO&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiPwunayvDeAhWMmlkKHSdCAW0Q6AEIJjAA#v=onepage&q=FORMAS DE ACCIÓN DEL OZONO&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=HIRHDwAAQBAJ&pg=PA66&dq=FORMAS+DE+ACCIÓN+DEL+OZONO&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiPwunayvDeAhWMmlkKHSdCAW0Q6AEIJjAA#v=onepage&q=FORMAS%20DE%20ACCIÓN%20DEL%20OZONO&f=false).

Casas, S. "Saccharomyces cerevisiae y Aspergillus oryzae : estimuladores y modificadores de la fermentación y crecimiento microbiano ruminal". *Scielo* [en línea], 2018, vol. 30, no. 2, pp. 4-6. [Consulta:20 septiembre 2018]. Disponible en:
<http://scielo.sld.cu/pdf/rpa/v30n2/rpa01218.pdf>.

CASTRO ALCOCER, GABRIEL ELIAS. Determinación de la Actividad Antimicrobiana del Extracto Etanólico de las Hojas y Flores de Iso (*Dalea mitisii*) [en línea]. (tesis). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamaba, Ecuador. 2012. [Consulta:2018-09-21]. Disponible en:
<http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/2555/1/56T00322.pdf%0Ahttp://dspace.espace.edu.ec/handle/123456789/2555>.

Desmoulière, A., "Le miel : origine et composition". *Elsevier* [en línea], 2013, vol. 52, pp. 18-21. [Consulta: 21 septiembre 2018]. DOI 10.1016/j.actpha.2013.10.004. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0515370013004916>.

Díaz, J., et, al. "Efecto modulador de la ozonoterapia sobre la actividad del sistema inmune". *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* [en línea], 2013, vol. 29, no. 2, pp. 2-3. [Consulta: 21 septiembre 2018]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892013000200005.

Duttman, C., et, al. *La Apicultura y Factores que Influyen en Producción, Calidad, Inocuidad y Comercio de la Miel* [en línea]. Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria, INTA. [Consulta: 21 septiembre 2018]. Disponible en: <http://www.inta.gob.ni/biblioteca/images/pdf/guias/guia de apicultura.pdf>.

FAJARDO CASTILLO, ERICKA ESPERANZA y SARMIENTO FORERO, SANDRA CONSTANZA. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces Cerevisiae* [en línea]. (tesis). Ponticia Universidad Javeriana. 2007. pp.39-42. [Consulta: 21 septiembre 2018]. Disponible en: <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis26.pdf>.

FAO., *Comisión del Codex alimentarius*[en línea]. Secretaría del Programa Conjunto FAO/OMS. [Consulta: 21 septiembre 2018]. Disponible en: http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCS/ccs7/S00_03s.pdf.

Folch, J.L., et, al. "La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*". *Revista Latinoamericana de Microbiología* [en línea], 2004, vol 46, no1-2, pp. 32-33. [Consulta: 21 septiembre 2018]. Disponible en: http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2004/mi04-1_2d.pdf.

Granadillo, I.L., et, al. "Efecto de la temperatura y el pH en la fermentación del mosto de *Agave cocui*". *Revista Multiciencias* [en línea], 2014, vol 14, no 4, p. 376. [Consulta: 22 septiembre 2018]. ISSN 1317-2255. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/904/90433839012.pdf>.

GUTIÉRREZ LÓPEZ, CRISTINA. Taxonomía de levaduras de origen enológico por espectrometría de masas [en línea]. (tesis). (Doctoral) Universidad Complutense De Madrid, Madrid, España. 2017. pp. 17-19. [Consulta: 2018-09-25]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/42698/1/T38793.pdf>.

Hernández, A. *Microbiología Industrial* [en línea]. S.l.: s.n. ISBN 996831255X,

9789968312554. 2003. [Consulta: 25 septiembre 2018]. Disponible en:
[https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&pg=PA28&dq=10%25+del+volumen+total+de+trabajo+Microbiologia+Industrial.+hernandez&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjboaG67fHfAhVNzlkKHwK_AbEQ6AEIJzAA#v=onepage&q=10%25 del volumen total de trabajo Microbiologia Indus.](https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&pg=PA28&dq=10%25+del+volumen+total+de+trabajo+Microbiologia+Industrial.+hernandez&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjboaG67fHfAhVNzlkKHwK_AbEQ6AEIJzAA#v=onepage&q=10%25+del+volumen+total+de+trabajo+Microbiologia+Indus)

HERNÁNDEZ AGUIRRE, LUI SANTIAGO. Determinación del Potencial Nutracéutico y la Actividad Antioxidante de la Miel Propolizada Elaborada por la Empresa Apicare, Riobamba-Chimborazo [en línea]. (tesis). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2013. pp. 31-32. [Consulta: 28 septiembre 2018]. Disponible en:
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3190/1/56T00428.pdf>.

Hidalgo, F.J. y Torres, L.M. "Ozonoterapia en medicina del dolor. Revisión". *Scielo* [en línea], 2013, vol 20, no 6, pp. 292-293. [Consulta: 5 octubre 2018]. Disponible en:
http://scielo.isciii.es/pdf/dolor/v20n6/03_revison-mba.pdf.

Ingraham, J.L. y Ingraham, C.A. *Introducción a la Microbiología, Volumen 2* [en línea]. Ilustrada. Barcelona: Reverte, 1998. [Consulta: 07 octubre 2018]. Disponible en:
[https://books.google.com.ec/books?id=dUEZSXaz2UC&pg=PA346&dq=que+es+candida+albicans++John+L.+Ingraham&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjI3qPF6PDfAhXswVkkKHQU5Dy0Q6AEIKjAA#v=onepage&q=que es candida albicans John L. Ingraham&f=](https://books.google.com.ec/books?id=dUEZSXaz2UC&pg=PA346&dq=que+es+candida+albicans++John+L.+Ingraham&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjI3qPF6PDfAhXswVkkKHQU5Dy0Q6AEIKjAA#v=onepage&q=que+es+candida+albicans+John+L.+Ingraham&f=)

James, R.R. "Potential of Ozone as a Fumigant to Control Pests in Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Hives". *Journal of Economic Entomology* [en línea], 2011, vol. 104, no. 2, pp. 355-358. [Consulta: 10 octubre 2018]. ISSN 00220493. DOI 10.1603/EC10385. Disponible en: <https://academic.oup.com/jee/article-lookup/doi/10.1603/EC10385>.

LAFORET AGUILERA, LESLIE. Estudio de Pga 26, una Proteína Implicada en la Arquitectura de la Pared Celular de *Candida Albicans* [en línea]. (tesis). Universitat de València, Valencia, España. 2010. pp.5-6. [Consulta: 2018-10-10]. Disponible en:
<https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/31891/laforet.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Lesser, R. *Manejo y Crianza Práctica De Las Abejas* [en línea]. Santiago de Chile. 1987. [Consultado: 13 octubre 2018]. Disponible en:
https://books.google.com.ec/books?id=GUKUprPNssUC&pg=PA56&dq=CARACTERISTICAS+FISICAS+DE+LA+MIEL+DE+ABEJA&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjf_naiPbdAhUFvFkKHYvOAggQ6AEIKDAA#v=onepage&q=CARACTERISTICAS+FISICAS+DE+LA+MIEL+DE+ABEJA&f=

Losada, S., et, al. "Escalado de la fermentación incrementada en la producción de estreptoquinasa recombinante". *Tecnología Química* [en línea], 2017, (Cuba) vol. XXXVII, no. 1, pp. 111-112. [Consulta: 15 octubre 2018]. ISSN 0041-8420. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4455/445552837009.pdf>.

MÉNDEZ CORDOVEZ, CHARLÍN. Efectos del ozono en un modelo experimental de fibrosis pulmonar inducida con bleomicina [en línea]. (tesis).(Doctoral) Universidad de las Palmas de Gran Canaria.2015. p. 28. [Consulta: 2018-10-15]. Disponible en: https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/21857/4/0733979_00000_0000.pdf.

Mendoza, A. "El origen de la Acidez en la Glucólisis Anaerobia". *Revista de Educación Bioquímica* [en línea], 2008, (México) vol. 27, no. 4, pp. 111-112. [Consulta: 15 octubre 2018]. ISSN 1665-1995. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/490/49011464002.pdf>.

Monter, S. *El Uso del Ozono en Medicina* [en línea]. [Consulta: 15 octubre 2018]. Disponible en: http://www.mundialsiglo21.com/novedades/2013jul_ozono_medicina.pdf.

MORALES LÓPEZ, RENE. Las Paredes Celulares de Levadura *Saccharomyces Cerevisiae*: un Aditivo Natural Capaz de Mejorar la Productividad y Salud del Pollo de Engorde [en línea].(tesis) Universitat Autònoma De Barcelona, Barcelona, España. 2009. pp. 81-82. [Consulta 2018-10-17]. Disponible en: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5689/rml1de1.pdf>.

NIETO GALARZA, HERNÁN OSWALDO. Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae* y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtener etanol [en línea]. (tesis) Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador. 2009. pp. 12-13. [Consulta: 2018-10-17]. Disponible en: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/990/1/T-ESPE-026782.pdf>.

OLEA BARRIONUEVO, DELFINA. Presencia de *Candida albicans* y su relación con los valores de CD4+ en pacientes con infección por VIH [en línea]. (tesis). (Doctoral) Universidad De Granada, Granada. 1995. p.6. [Consulta: 2018-10-20]. Disponible en: <https://hera.ugr.es/tesisugr/16448704.pdf>.

Orberá, T. de los M. "Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos". *Revista Cubana de Salud Pública* [en línea], 2004, (Cuba) vol. 30, no. 3, pp. 2-4. [Consulta: 22 octubre 2018]. ISSN 0864-3466. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=21430316>.

ORTEGA RIVEROS, MARCELO. Estudio de la patogenicidad de *Candida* y de la actividad de los fármacos antifúngicos en un modelo animal en *Caenorhabditis elegans* [en línea]. (tesis). (Doctoral) Universidad del País Vasco, Leioa. 2015. pp.4-7. [Consulta: 2018-10-25]. Disponible en:
https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/18772/TESIS_ORTEGA_RIVEROS_MARCELO.pdf?sequence=1.

PAREDES RODRÍGUEZ, BENJAMIN FRANKLIN. La Apicultura y el desarrollo del Turismo Rural en la Parroquia Santa Rosa, Cantón Ambato, Provincia De Tungurahua[en línea]. (tesis). Universidad Técnica De Ambato, Ambato, Ecuador. 2015. pp.3-4. [Consulta: 2018-10-25]. Disponible en:
<http://repo.uta.edu.ec/bitstream/handle/123456789/5301/Mg.DCEv.Ed.1859.pdf?sequence=3>.

Perez, E., et al. "Caracterización fermentativa de levaduras productoras de etanol a partir de jugo de *Agave cupreata* en la elaboración de mezcal". *Revista Mexicana de Ingeniería Química* [en línea], 2013, (México) vol. 12, no. 3, pp. 452-453. [Consulta: 28 octubre 2018]. ISSN 1665- 2738. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/pdf/620/62029966008.pdf>.

Pretell, C., et al. "Effect of gaseous ozone on physicochemical characteristics, microbiological and general appearance of fresh wonderful *Punica granatum L*". *Journal Scientia Agropecuaria* [en línea], 2016, (Perú) vol. 7, no. 3, pp. 173-174. [Consulta: 1 noviembre 2018]. ISSN 2077-9917. DOI 10.17268/sci.agropecu.2016.03.03. Disponible en:
<http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/1164>.

Quesada, C., et al. "CANDIDA DUBLINIENSIS : (Caracterización, diagnóstico, Importancia en pacientes Inmunocomprometidos y diferenciación de *C. albicans*)". *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica* [en línea], 2007, vol. LXIV, no. 578, pp. 43. [Consulta: 1 noviembre 2018]. Disponible en: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/578/art9.pdf>.

Riverón, E., et al. "Estación de trabajo para el estudio de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* mediante el método de turbidez". *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* [en línea], 2012, (Cuba) vol. 43, no. 2, pp. 1-4. [Consulta: 01 noviembre 2018]. ISSN 0253-5688. Disponible en:
<https://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB-2012-2-071-075.pdf>.

Roy, R., et al. "Review: Nectar biology: from molecules to ecosystems". *Plant Science* [en línea], 2017, vol. 262, pp. 4-6. [Consulta: 01 noviembre 2018]. ISSN 0168-9452. DOI 10.1016/j.plantsci.2017.04.012. Disponible en:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.04.012>.

SAGARPA. *Buenas prácticas pecuarias en la producción primaria de miel* [en línea]. [Consulta: 01 noviembre 2018]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/395732/Manual_BPP_en_la_Produccion_primaria_de_Miel_octubre_2018.pdf.

Salamanca, G., et al. "Características microbiológicas de las mieles tropicales de *Apis mellifera* 2000". *Journal Apiservices* [en línea], 2000, pp. 2-5. [Consulta: 16 enero 2019]. Disponible en: <https://www.apiservices.biz/es/articulos/ordenar-por-popularidad/725-caracteristicas-microbiologicas-de-las-mieles-tropicales>.

Salamanca, G., et al. "Parámetros fisicoquímicos de calidad de la jalea real elaborada por *Apis mellifera* L.(Hymenoptera: Apidae), en Colombia". *Journal Zootecnia Trop* [en línea], 2013, (Colombia) vol. 31, no. 4, p. 312. [Consulta: 07 noviembre 2018]. ISSN 0798-7269. Disponible en: [http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Par+metros+fi+sicoqu+micos+de+calidad+de+la+jalea+real+elaborada+por+Apis+mellifera+L.+\(+Hymenoptera+:+Apidae+\),+en+Colombia#0](http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Par+metros+fi+sicoqu+micos+de+calidad+de+la+jalea+real+elaborada+por+Apis+mellifera+L.+(+Hymenoptera+:+Apidae+),+en+Colombia#0).

Schwartz, A., "Ozonoterapia en el tratamiento de la vulvo-vaginitis recurrente por *Candida albicans*". *Revista Española de Ozonoterapia* [en línea], 2015, vol. 5, no. 1, pp. 95. [Consulta: 07 noviembre 2018]. Disponible en: [Dialnet-OzonoterapiaEnElTratamientoDeLaVulvovaginitisRecur-5095044 \(7\).pdf](http://dialnet.org/urn/dialnet/5095044/1/7/0).

Souza, C., et al. "Infección por *Saccharomyces cerevisiae*". *Revista Iberoamericana de Micología* [en línea], 2013, vol. 30, no. 3, pp. 206. [Consulta: 07 noviembre 2018]. ISSN 1130-1406. DOI 10.1016/j.riam.2013.03.001. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.03.001>.

Suárez, C., et al. "Levadura *Saccharom myces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión Bibliográfica". *Journal ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* [en línea], 2016, (Cuba) vol. 50, no. 1, pp. 21-25. [Consulta: 09 noviembre 2018]. ISSN 0138-6204. DOI 10.2307/1939970. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223148420004.pdf>.

Suárez, C. y Guevara, C.A., "Levadura *Saccharom myces cerevisiae* en la alimentación de rumiantes . Revisión bibliográfica". *Journal Redalyc, ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* [en línea], 2017, (Cuba) vol. 51, no. 2, pp. 21-26. [Consulta: 09 noviembre 2018]. ISSN 0138-6204. Disponible en:

<http://www.redalyc.org/pdf/2231/223154251004.pdf>.

TEGUCIGUALPA, M.D.C., *Manual Técnico de Apicultura* [en línea]. Dicta. Sac. [Consulta: 09 noviembre 2018]. Disponible en:

http://www.mieldemalaga.com/data/manual_apicultura.hon.pdf.

Tezcan, A., et, al. "The Beneficial Effects of Ozone Therapy in Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Mice". *Journal Pharmacological Reports* [en línea], 2017, vol. 17, pp. 4. [Consulta: 12 noviembre 2018]. ISSN 1734-1140. DOI 10.1016/j.pharep.2017.11.003. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2017.11.003>.

Tortora, G.J., et, al. *Introducción a la Microbiología* [en línea]. 9na. ed. España: Editorial Médica Panamericana, 2007 p. 177 ISBN 9788429141504. [Consulta: 12 noviembre 2018]. Disponible en:

<https://books.google.com.ec/books?id=Nxb3iETuwpIC&printsec=frontcover&dq=introduccion+a+la+microbiologia&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwi6i7uavvHfAhWytVkKHcOgCfgQ6AEIJzAA#v=onepage&q=introduccion+a+la+microbiologia&f=>

TRILLO SOLER, ALICIA. Adulteración de la cera de abeja. Problemática en su industrialización y comercialización [en línea]. (tesis) Universitat Politècnica de València, Valencia, España. 2017. pp.1-2. [Consulta: 12 noviembre 2018]. Disponible en: [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/88698/TRILLO - Adulteración de la cera de abeja. Problemática en su industrialización y comercialización..pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/88698/TRILLO-Adulteración%20de%20la%20cera%20de%20abeja.%20Problemática%20en%20su%20industrialización%20y%20comercialización..pdf?sequence=1).

Vázquez, H.J. y Dacosta, O. "Alcoholic fermentation : An option for renewable energy production from agricultural residues". *Journal INGENIERIA Investigación y Tecnología* [en línea], 2007, vol. 8, no. 4, pp. 251-252. [Consulta: 17 noviembre 2018]. ISSN 1405-7743. Disponible en: <http://www.ejournal.unam.mx/ict/vol0804/ICT000800404.pdf>.

Wachner, C. "La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados". *Revista digital Universitaria* [en línea], 2014, vol. 15, no. 8, pp. 4-5. [Consulta: 21 noviembre 2018]. ISSN 1607-6079. Disponible en:

<http://www.revista.unam.mx/vol.15/num8/art64/art64.pdf>.

Weber, W.J. Control de la calidad del agua: procesos fisicoquímicos [en línea]. Reimpresión. Michigan: Reverté, 1979. ISBN 8429175229, 9788429175226. [Consulta: 28 noviembre 2018]. Disponible en:

<https://books.google.com.ec/books?id=TLpzh5HQYvgC&pg=PA398&dq=QUE+ES+OZONO&hl=es->

419&sa=X&ved=0ahUKEwiDotbGq_DeAhWG7lMKHegDAfgQ6AEIODAD#v=onepage
&q=QUE ES OZONO&f=

YÁNEZ FREIRE, KAREN NICOLE. Evaluación del efecto de levaduras comerciales sobre la fermentación ruminal y digestibilidad de los nutrientes mediante un sistema de medición de gas in vitro [en línea]. (tesis) Escuela Superior Politecnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2017. pp.4-5. [Consulta: 10 diciembre 2018]. Disponible en:
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7155/1/17T1472.pdf>.

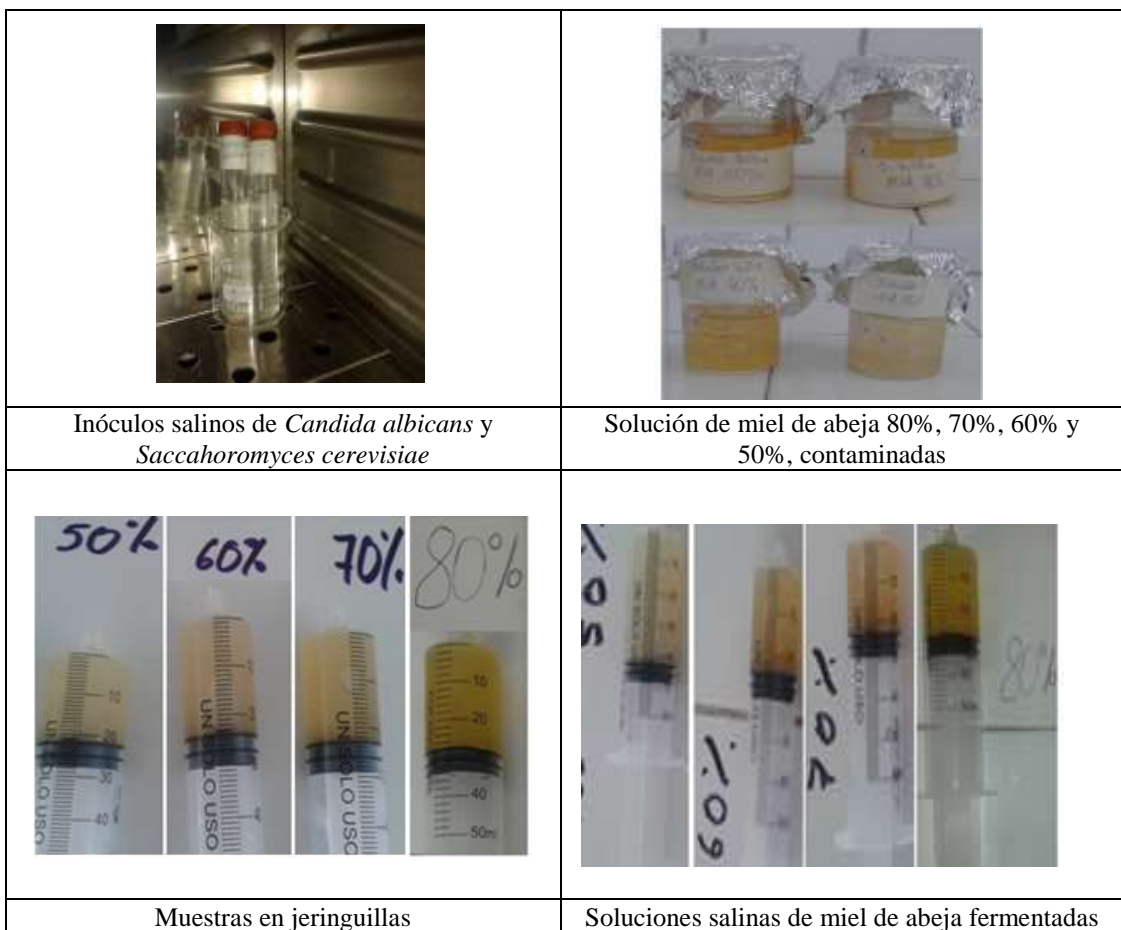
ANEXOS

ANEXO A: Obtención de miel de abeja



Fotografía 1-4: Miel de abeja genuina ASOPROACH.

ANEXO B: Determinación de la concentración no letal de miel de abeja para las levaduras



Fotografía 2-4: Elaboración y determinación de la concentración no letal de miel de abeja para levaduras.




ANEXO C: Dispositivo para procesos de ozonización



Fotografía 3-4: Embudo de separación de 100 mL y material de laboratorio.



ANEXO D: Proceso de ozonización de solución salina de miel de abeja al 50%.

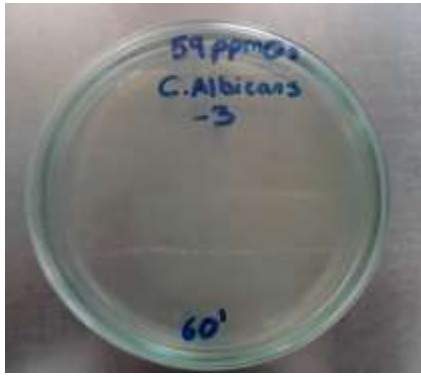



	
<p>Absorción directa de muestra en jeringuilla NIPRO.</p>	<p>Sellado de jeringuilla</p>
	
<p>Muestras en cooler.</p>	

Fotografía 4-4: Ejecución del proceso de ozonización de las soluciones salinas de miel de abejas al 50 %, previamente inoculadas con *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* respectivamente.





ANEXO E: Análisis microbiológico de *Candida albicans*, muestras sin fermentar.

	
<p>Resultado microbiológico muestra blanco <i>Candida albicans</i></p>	<p>Resultado microbiológico de <i>Candida albicans</i> a 19 ppm de ozono</p>

	
<p>Resultado microbiológico de <i>Candida albicans</i> a 59 ppm de ozono</p>	<p>Resultado microbiológico de <i>Candida albicans</i> a 99 ppm de ozono</p>



Fotografía 5-4: Recuento microbiológico de *Candida albicans* después del proceso de ozonización, muestras sin fermentar.

ANEXO F: Análisis microbiológico de *Saccharomyces cerevisiae*, muestras sin fermentar.

	
<p>Resultado microbiológico muestra blanco <i>Saccharomyces cerevisiae</i></p>	<p>Resultado microbiológico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a 19 ppm de ozono</p>
	
<p>Resultado microbiológico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a 59 ppm de ozono</p>	<p>Resultado microbiológico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a 99 ppm de ozono</p>


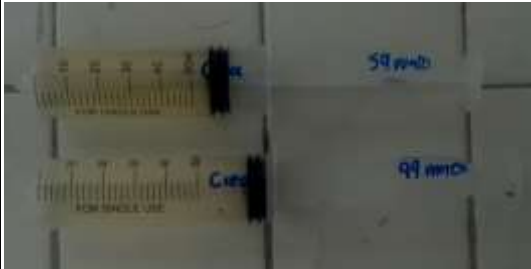
Fotografía 6-4: Recuento microbiológico de *Saccharomyces cerevisiae* después del proceso de ozonización, muestras sin fermentar.

ANEXO G: Monitoreo del proceso de fermentación de *Candida albicans*

	
<p>Muestras de solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con <i>Candida albicans</i></p>	<p>Muestras fermentadas inoculadas con <i>Candida albicans</i></p>

Fotografía 7-4: Monitoreo del proceso de fermentación de soluciones salinas de miel de abeja al 50% inoculada con *Candida albicans*.

ANEXO H: Monitoreo del proceso de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae*

	
<p>Muestras de soluciones salinas de miel de abeja al 50% inoculada con <i>Saccharomyces cerevisiae</i></p>	<p>Muestras fermentadas inoculadas con <i>Saccharomyces cerevisiae</i></p>

Fotografía 8-4: Monitoreo del proceso de fermentación de soluciones salinas de miel de abeja al 50% inoculada con *Saccharomyces cerevisiae*

ANEXO I: Valoración de oxígeno molecular por degradación de ozono

	
Adición de hidróxido de sodio (NaOH)	Incorporación de glucosa
	
Cambio de coloración de las soluciones	Expulsión del gas existente en la jeringuilla
	
Coloración azul pálido, provocada por el gas de la jeringuilla (presencia de oxígeno).	

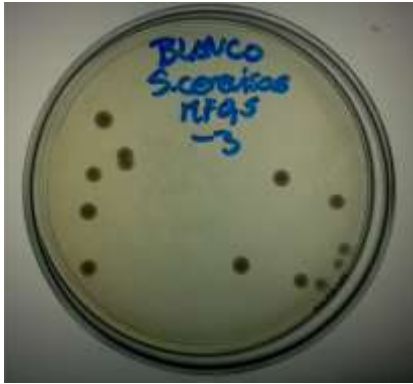

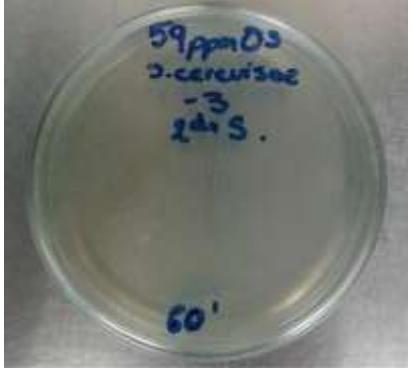
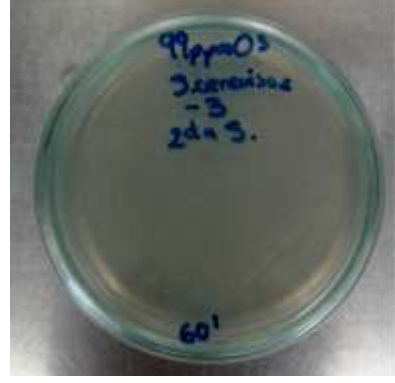
Fotografía 9-4: Valoración de oxígeno molecular de las muestras en jeringuillas fermentadas inoculadas con *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* respectivamente, mediante una prueba experimental colorimétrica.

ANEXO J: Análisis microbiológico de *Candida albicans*, muestras fermentadas.

<p>Resultado microbiológico muestra blanco <i>Candida albicans</i></p>	<p>Resultado microbiológico de <i>Candida albicans</i> a 19 ppm de ozono</p>
<p>Resultado microbiológico de <i>Candida albicans</i> a 59 ppm de ozono</p>	<p>Resultado microbiológico de <i>Candida albicans</i> a 99 ppm de ozono</p>

Fotografía 10-4: Análisis microbiológico de soluciones salinas de miel de abeja al 50% inoculadas con *Cándida albicans*, muestras fermentadas.

ANEXO K: Análisis microbiológico de *Saccharomyces cerevisiae*, muestras fermentadas

	
<p>Resultado microbiológico muestra blanco <i>Saccharomyces cerevisiae</i></p>	<p>Resultado microbiológico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a 19 ppm de ozono</p>
	
<p>Resultado microbiológico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a 59 ppm de ozono</p>	<p>Resultado microbiológico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a 99 ppm de ozono</p>

Fotografía 11-4: Análisis microbiológico de soluciones salinas de miel de abeja al 50% inoculadas con *Cándida albicans*, muestras fermentadas.

ANEXO L: Socialización a ASOPROACH.



Fotografía 12-4: Socialización de los resultados obtenidos.

ANEXO M: Recuento microbiológico de la solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con *Candida albicans*, tras el proceso de ozonización, muestra sin fermentar.

Concentración de ozono	Recuento microbiológico de <i>Candida albicans</i> (UPC/mL)											
	Primera réplica			PROM 1	Segunda réplica			PROM 2	Tercera réplica			PROM 3
0 ppm (Muestra Blanco)	14	16	14	1,5x10 ⁵	18	15	17	1,7x10 ⁵	17	17	16	1,7x10 ⁵
19 ppm	4	6	4	4,7x10 ⁴	3	5	5	4,3x10 ⁴	4	4	7	5,0x10 ⁴
59 ppm	0	0	2	7x10 ³	3	1	0	1,3x10 ⁴	2	0	1	1,0x10 ⁴
99 ppm	5	7	5	5,7x10 ⁴	4	6	6	5,3x10 ⁴	5	4	7	5,3x10 ⁴

Fuente: Análisis de laboratorio

Elaborado por: Cristina Daquilema, 2019

ANEXO N: Recuento microbiológico de la solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con *Saccharomyces cerevisiae*, tras el proceso de ozonización, muestra sin fermentar.

Concentración de ozono	Recuento microbiológico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (x10 ⁻³ /mL)											
	Primera réplica			PROM 2	Segunda réplica			PROM 2	Tercera réplica			PROM 3
0 ppm (Muestra Blanco)	13	15	15	1,4x10 ⁵	17	13	15	1,5x10 ⁵	15	15	17	1,7x10 ⁵
19 ppm	2	3	3	2,7x10 ⁴	2	2	4	2,7x10 ⁴	3	5	2	3,3x10 ⁴
59 ppm	4	2	3	3,0x10 ⁴	4	4	3	3,7x10 ⁴	5	4	3	4,0x10 ⁴
99 ppm	3	2	2	2,3x10 ⁴	3	4	3	3,3x10 ⁴	3	5	4	4,0x10 ⁴

Fuente: Análisis de laboratorio

Elaborado por: Cristina Daquilema, 2019

ANEXO O: Monitoreo del proceso de fermentación de solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con *Candida albicans*

Tiempo de Fermentación de la solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con <i>Candida albicans</i>											
0 ppm de ozono						19 ppm de ozono					
1 Repetición		2 Repetición		3 Repetición		1 Repetición		2 Repetición		3 Repetición	
Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado	Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado	Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado	Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado	Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado	Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0
24	0	24	0	24	0	24	0	24	0	24,00	0
48	0	48	0	48	0	48	0	48	0	48,00	0
72	0	72	0	72	0	72	0	72	0	72,00	0
88,58	1	88,92	1	86,50	1	84,28	1	82,25	1	84,42	1
96,33	2	96,67	2	94,25	2	86,82	2	84,80	2	86,95	2
103,33	3	103,68	3	101,25	3	89,22	3	87,22	3	89,38	3
108,90	4	108,25	4	106,83	4	91,62	4	89,58	4	91,83	4
111,00	5	111,37	5	109,00	5	93,70	5	91,67	5	93,92	5
112,95	6	112,22	6	110,83	6	95,13	6	93,08	6	95,30	6
114,32	7	114,67	7	112,25	7	96,70	7	94,67	7	96,88	7
115,57	8	115,92	8	113,50	8	98,25	8	96,25	8	98,42	8
117,15	9	117,50	9	115,08	9	100,08	9	98,00	9	100,50	9
118,33	10	118,65	10	116,38	10	102,12	10	100,03	10	102,42	10
119,80	11	119,98	11	117,75	11	103,57	11	101,53	11	103,83	11
121,20	12	121,45	12	119,17	12	104,83	12	102,87	12	105,08	12
122,62	13	122,83	13	120,58	13	106,25	13	104,20	13	106,50	13
124,07	14	124,33	14	122,00	14	107,73	14	105,70	14	108,00	14
125,73	15	125,92	15	123,67	15	109,38	15	107,33	15	109,67	15
127,42	16	127,68	16	125,33	16	110,72	16	108,67	16	110,97	16
129,07	17	129,32	17	127,00	17	111,68	17	109,65	17	111,83	17
130,78	18	130,92	18	128,67	18	112,52	18	110,48	18	112,58	18
132,08	19	132,28	19	130,00	19	113,17	19	111,12	19	113,33	19

133,13	20	133,50	20	131,08	20	113,82	20	111,78	20	113,97	20
134,03	21	134,50	21	132,00	21	114,42	21	112,38	21	114,58	21
134,75	22	135,02	22	132,67	22	114,92	22	112,97	22	115,17	22
135,32	23	135,67	23	133,25	23	115,62	23	113,58	23	115,83	23
135,97	24	136,25	24	133,83	24	116,45	24	114,40	24	116,53	24
136,52	25	136,88	25	134,47	25	117,03	25	115,03	25	117,08	25
137,07	26	137,43	26	135,07	26	117,70	26	115,67	26	117,67	26
137,60	27	137,90	27	135,60	27	118,52	27	116,50	27	118,25	27
138,12	28	138,43	28	136,12	28	119,35	28	117,30	28	118,87	28
138,55	29	138,95	29	136,58	29	120,22	29	118,17	29	119,37	29
139,13	30	139,42	30	137,10	30	120,98	30	118,92	30	119,95	30
139,58	31	139,92	31	137,55	31	121,82	31	119,75	31	120,45	31
140,08	32	140,42	32	138,02	32	122,58	32	120,58	32	121,00	32

Elaborado por: Cristina Daquilema, 2019

Fuente: Análisis de laboratorio.

Tiempo de fermentación de la solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con <i>Candida albicans</i>											
59 ppm de ozono						99 ppm de ozono					
1 Repetición		2 Repetición		3 Repetición		1 Repetición		2 Repetición		3 Repetición	
Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado	Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado	Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado	Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado	Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado	Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	24	0	24	0	24	0	24	0	24	0
48	0	48	0	48	0	48	0	48	0	48	0
72	0	72	0	72	0	72	0	72	0	72	0
96	0	96	0	96	0	94,33	1	93,83	1	92,33	1
120	0	120	0	120	0	98,17	2	97,67	2	96,12	2
128,17	1	128,67	1	127,42	1	103,75	3	103,22	3	101,67	3
133,17	2	133,70	2	132,50	2	107,32	4	106,82	4	105,17	4
139,78	3	139,97	3	138,62	3	110,18	5	109,68	5	108,00	5
144,42	4	144,83	4	143,25	4	112,53	6	112,02	6	110,50	6

148,67	5	149,17	5	147,50	5	114,68	7	114,20	7	112,58	7
152,72	6	152,92	6	151,55	6	117,30	8	116,80	8	115,17	8
155,67	7	156,02	7	154,50	7	119,42	9	118,92	9	117,33	9
158,42	8	158,67	8	157,25	8	121,17	10	120,67	10	119,08	10
160,50	9	160,92	9	159,33	9	122,83	11	122,32	11	120,75	11
161,97	10	162,15	10	160,92	10	124,50	12	124,05	12	122,42	12
163,17	11	163,67	11	162,17	11	126,30	13	125,83	13	124,22	13
164,43	12	165,00	12	163,35	12	127,83	14	127,37	14	125,83	14
165,62	13	166,37	13	164,53	13	129,48	15	129,03	15	127,42	15
166,87	14	167,70	14	165,78	14	131,28	16	130,78	16	129,25	16
168,12	15	168,87	15	167,03	15	132,95	17	132,50	17	130,83	17
169,38	16	169,92	16	168,28	16	134,30	18	133,87	18	132,17	18
170,60	17	170,97	17	169,53	17	135,62	19	135,28	19	133,50	19
171,95	18	171,92	18	170,87	18	136,92	20	136,58	20	134,83	20
173,25	19	172,92	19	172,20	19	137,82	21	137,50	21	135,75	21
174,58	20	173,00	20	173,53	20	138,87	22	138,48	22	136,78	22
175,95	21	174,08	21	174,92	21	139,82	23	139,50	23	137,75	23
177,38	22	175,25	22	176,33	22	140,68	24	140,35	24	138,63	24
178,83	23	176,30	23	177,75	23	141,58	25	141,25	25	139,52	25
180,12	24	177,37	24	179,05	24	142,50	26	142,18	26	140,43	26
181,37	25	178,33	25	180,30	25	143,45	27	143,17	27	141,37	27
182,65	26	179,33	26	181,55	26	144,35	28	144,08	28	142,30	28
183,83	27	180,58	27	182,77	27	145,30	29	144,92	29	143,22	29
184,95	28	181,75	28	183,95	28	146,12	30	145,00	30	144,05	30
186,00	29	183,05	29	185,17	29	146,95	31	145,95	31	144,88	31
187,28	30	184,17	30	186,35	30	147,85	32	146,87	32	145,68	32
188,40	31	185,25	31	187,43	31						
189,42	32	186,25	32	188,33	32						

ANEXO P: Monitoreo del proceso de fermentación de solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con *Saccharomyces cerevisiae*.

Tiempo de fermentación de la solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>											
0 ppm de ozono						19 ppm de ozono					
1 Repetición		2 Repetición		3 Repetición		1 Repetición		2 Repetición		3 Repetición	
Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado	Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado	Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado	Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado	Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado	Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	24	0	24	0	24	0	24	0	24	0
51,68	1	50,75	1	51,75	1	48	0	48	0	48	0
53,50	2	55,00	2	56,00	2	72	0	72	0	72	0
55,25	3	57,02	3	58,07	3	96,00	0	96,00	0	96,00	0
57,00	4	58,97	4	59,97	4	123,42	1	121,25	1	120,97	1
58,78	5	60,72	5	61,72	5	125,92	2	123,85	2	123,85	2
60,50	6	62,55	6	63,55	6	127,93	3	125,83	3	125,83	3
62,15	7	64,12	7	65,12	7	130,27	4	128,25	4	128,00	4
63,77	8	65,67	8	66,67	8	132,93	5	130,58	5	131,62	5
65,43	9	67,22	9	68,22	9	135,18	6	133,40	6	134,45	6
67,00	10	68,72	10	69,73	10	137,18	7	135,92	7	136,82	7
68,57	11	70,22	11	71,25	11	139,00	8	137,33	8	138,48	8
70,07	12	71,67	12	72,70	12	141,67	9	139,50	9	140,62	9
71,60	13	73,12	13	74,12	13	143,20	10	141,48	10	142,53	10
73,08	14	74,50	14	75,50	14	144,73	11	143,32	11	144,38	11
74,38	15	75,82	15	76,82	15	146,07	12	145,07	12	146,10	12
75,70	16	77,10	16	78,10	16	148,40	13	147,70	13	147,65	13
77,03	17	78,32	17	79,32	17	149,78	14	150,22	14	148,13	14
78,32	18	79,50	18	80,53	18	151,33	15	152,63	15	149,58	15
79,53	19	80,68	19	81,68	19	152,85	16	153,95	16	150,90	16
80,68	20	81,80	20	82,80	20	154,40	17	155,18	17	151,32	17
81,75	21	82,82	21	83,82	21	155,92	18	157,33	18	152,45	18

82,75	22	83,82	22	84,82	22	157,40	19	158,42	19	153,32	19
83,70	23	84,78	23	85,75	23	158,67	20	159,50	20	154,63	20
84,53	24	85,67	24	86,67	24	160,23	21	160,48	21	155,35	21
85,32	25	86,48	25	87,48	25	161,62	22	161,37	22	156,42	22
85,98	26	87,22	26	88,22	26	162,95	23	162,27	23	157,33	23
86,58	27	88,00	27	89,00	27	164,22	24	164,08	24	159,18	24
87,08	28	88,67	28	89,68	28	165,48	25	165,93	25	160,33	25
87,55	29	89,28	29	90,28	29	166,57	26	166,72	26	161,48	26
87,97	30	89,87	30	90,87	30	167,52	27	167,47	27	162,37	27
88,22	31	90,35	31	91,35	31	168,27	28	168,18	28	163,25	28
88,50	32	90,77	32	91,72	32	168,88	29	168,85	29	164,92	29
						169,40	30	169,48	30	165,55	30
						169,82	31	169,07	31	165,62	31
						170,23	32	170,42	32	166,52	32

Elaborado por: Cristina Daquilema, 2019

Fuente: Análisis de laboratorio.

Tiempo de fermentación de la solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>											
59 ppm de ozono						99 ppm de ozono					
1 Repetición		2 Repetición		3 Repetición		1 Repetición		2 Repetición		3 Repetición	
Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado	Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado	Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado	Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado	Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado	Tiempo (horas)	Volumen de CO ₂ desplazado
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	24	0	24	0	24	0	24	0	24	0
48	0	48	0	48	0	48	0	48	0	48	0
72	0	72	0	72	0	72	0	72	0	72	0
96	0	96	0	96	0	96	0	96	0	96	0
119,83	1	117,55	1	120	1	120	1	114,25	1	120,83	1
124,00	2	122,50	2	125,75	2	124,75	2	117,28	2	125,00	2
127,35	3	127,02	3	129,77	3	128,77	3	120,50	3	128,35	3

130,33	4	131,03	4	132,85	4	131,85	4	124,02	4	131,33	4
133,08	5	134,53	5	135,50	5	134,50	5	127,32	5	134,08	5
135,83	6	137,75	6	138,03	6	137,03	6	130,00	6	136,83	6
138,33	7	140,73	7	140,83	7	139,83	7	132,92	7	139,33	7
140,25	8	143,75	8	142,92	8	141,92	8	134,50	8	141,25	8
141,83	9	146,25	9	145,00	9	144,00	9	136,52	9	142,83	9
143,42	10	148,28	10	146,75	10	145,75	10	138,53	10	144,42	10
145,02	11	150,02	11	148,40	11	147,40	11	140,33	11	146,02	11
146,57	12	151,50	12	150,02	12	149,02	12	142,00	12	147,57	12
148,17	13	152,75	13	151,50	13	150,50	13	144,67	13	149,17	13
149,67	14	153,82	14	153,03	14	152,03	14	146,22	14	150,67	14
151,17	15	154,78	15	154,60	15	153,60	15	147,80	15	152,17	15
152,78	16	155,78	16	156,15	16	155,15	16	149,33	16	153,78	16
154,33	17	156,82	17	157,67	17	156,67	17	150,83	17	155,33	17
155,67	18	157,78	18	159,17	18	158,17	18	152,28	18	156,67	18
156,77	19	158,67	19	160,58	19	159,58	19	153,67	19	157,77	19
157,75	20	159,42	20	162,00	20	161,00	20	154,98	20	158,75	20
159,02	21	160,20	21	163,32	21	162,32	21	156,23	21	160,02	21
160,00	22	160,98	22	164,43	22	163,43	22	157,42	22	161,00	22
160,98	23	161,73	23	165,33	23	164,33	23	158,62	23	161,98	23
161,93	24	162,50	24	166,08	24	165,08	24	159,50	24	162,93	24
162,85	25	163,25	25	166,83	25	165,83	25	160,62	25	163,85	25
163,77	26	163,97	26	167,58	26	166,58	26	161,57	26	164,77	26
164,55	27	164,70	27	168,30	27	167,30	27	162,45	27	165,55	27
165,25	28	165,38	28	169,07	28	168,07	28	163,28	28	166,25	28
165,92	29	166,08	29	169,78	29	168,78	29	164,03	29	166,92	29
166,58	30	166,75	30	170,45	30	169,45	30	164,80	30	167,58	30
167,27	31	167,43	31	171,13	31	170,13	31	165,52	31	168,27	31
167,92	32	168,08	32	171,78	32	170,78	32	166,17	32	168,92	32

ANEXO Q: Recuento microbiológico de la solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con *Candida albicans*, muestras fermentadas.

Concentración de ozono	Recuento microbiológico de <i>Candida albicans</i> (UPC/mL)											
	Primera réplica			PROM 1	Segunda réplica			PROM 2	Tercera réplica			PROM 3
0 ppm (Muestra Blanco)	14	17	17	1,6x10 ⁵	18	15	17	1,7x10 ⁵	17	18	17	1,7x10 ⁵
19 ppm	1	2	0	1,0x10 ⁴	0	2	2	1,3x10 ⁴	2	2	3	2,3x10 ⁴
59 ppm	0	1	0	3x10 ³	0	0	1	3x10 ³	0	1	1	7x10 ³
99 ppm	0	1	1	7x10 ³	2	1	2	1,7x10 ⁴	2	1	0	1,0x10 ⁴

Fuente: Análisis de laboratorio

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

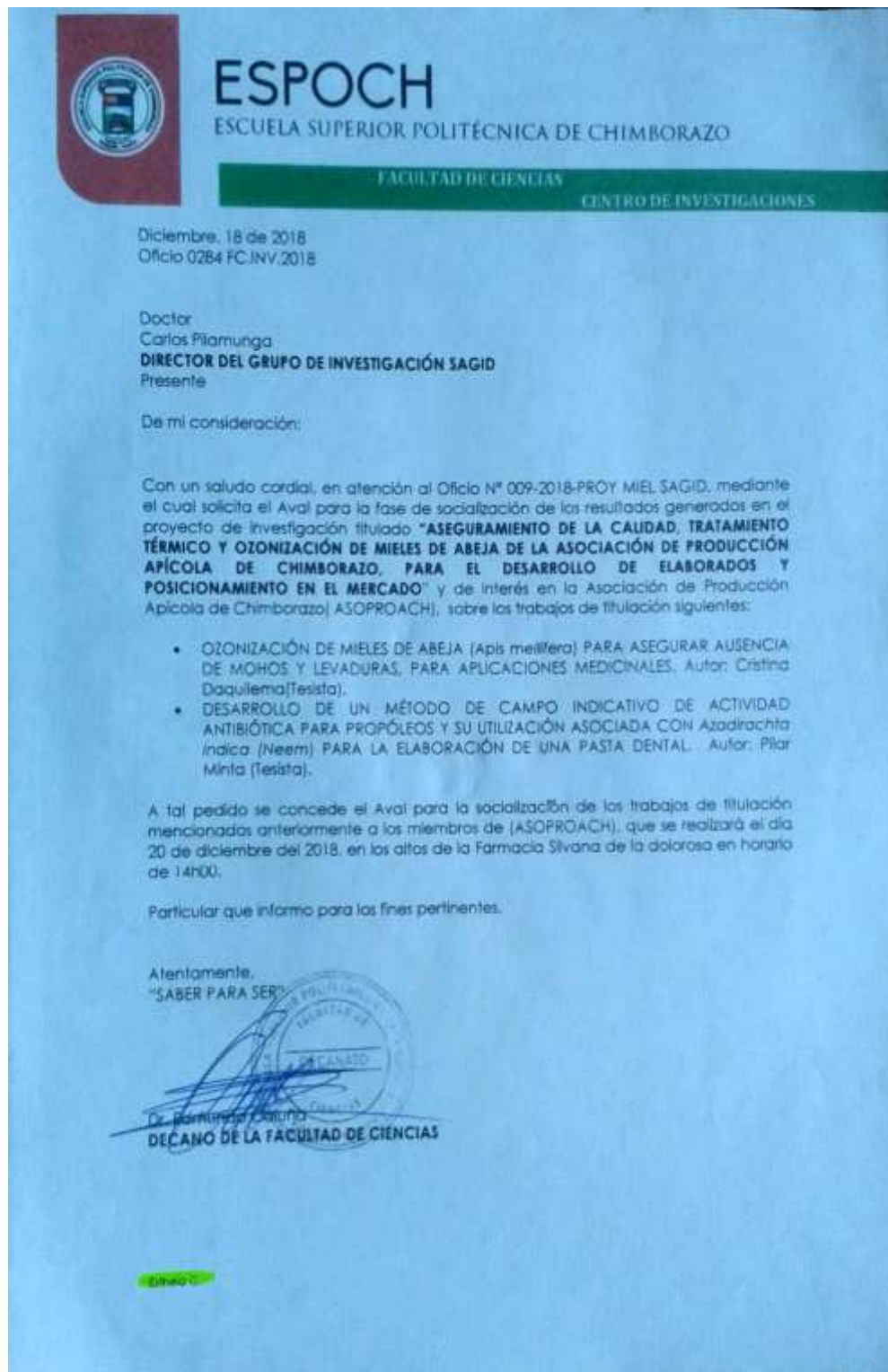
ANEXO R: Recuento microbiológico de la solución salina de miel de abeja al 50% inoculada con *Saccharomyces cerevisiae*, tras el proceso de ozonización.

Concentración de ozono	Recuento microbiológico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (UPC/mL)											
	Primera réplica			PROM 1	Segunda réplica			PROM 2	Tercera réplica			PROM 3
0 ppm (Muestra Blanco)	14	16	15	1,5x10 ⁵	17	15	15	1,6x10 ⁵	17	15	17	1,6x10 ⁵
19 ppm	1	1	0	7x10 ³	0	0	1	3x10 ³	1	0	1	7x10 ³
59 ppm	0	0	1	3x10 ³	2	1	0	1,0x10 ⁴	1	2	1	1,3x10 ⁴
99 ppm	0	1	1	7x10 ³	1	1	0	7x10 ³	2	0	1	1,0x10 ⁴

Fuente: Análisis de laboratorio

Realizado por: Cristina Daquilema, 2019

ANEXO S: Aval de la ESPOCH para la socialización.



Fotografía 13-4: Aval de la ESPOCH

ANEXO T: Certificado de ASOPROACH

CERTIFICADO

A petición de parte interesada, certifico que el día 20 de Diciembre del 2018, 14h00, se realizó la socialización de resultados a los miembros de la Asociación de Producción Apícola de Chimborazo, de los dos trabajos de titulación del proyecto interinstitucional (ESPOCH, SAGID, ASOPROACH), titulado "ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD, TRATAMIENTO TÉRMICO Y OZONIZACIÓN DE MIELES DE ABEJA DE LA ASOCIACIÓN DE PRODUCCIÓN APÍCOLA DE CHIMBORAZO, PARA EL DESARROLLO DE ELABORADOS Y POSICIONAMIENTO EN EL MERCADO", los trabajos socializados fueron:

- ✓ OZONIZACIÓN DE MIELES DE ABEJA (*Apis mellifera*) PARA ASEGURAR AUSENCIA DE MOHOS Y LEVADURAS, PARA APLICACIONES MEDICINALES.
Autor: Cristina Daquilema. (Tesisista)
- ✓ DESARROLLO DE UN MÉTODO DE CAMPO INDICATIVO DE ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA Y ANTIMICÓTICA PARA PROPÓLEOS Y SU UTILIZACIÓN ASOCIADA CON *Azadirachta indica* (Neem) PARA LA ELABORACIÓN DE UNA PASTA DENTAL.
Autor: Pilar Minta. (Tesisista)

Particular que certifico, pudiendo los interesados hacer uso necesario del presente certificado

Riobamba 11 de enero del 2019



Dr. Eduardo Fonseca.
PRESIDENTE ASOPROACH

Fotografía 14-4: Certificado de ASOPROACH.