



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 1

Neiva, 05 de agosto de 2022

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Neiva- Huila

El (los) suscrito(s):

Diego Alexander Fúquene Medina, con C.C. No 1080266803, Lorena Silva Merchán, con C.C. No. 1075319242, Autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado titulado “Extracción y evaluación biológica del veneno del *Bombus cf atratus* sobre las bacterias *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus*”, presentado y aprobado en el año 2022 como requisito para optar al título de Licenciado en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología; Autorizo(amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que, con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales “open access” y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

ELAUTOR/ESTUDIANTE: Diego Alexander Fúquene

ELAUTOR/ESTUDIANTE: Lorena Silva Merchán

Firma: Diego Alexander Fúquene

Firma: Lorena Silva M.

Vigilada Mineducación



TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: Extracción y evaluación biológica del veneno del *Bombus cf atratus* sobre las bacterias *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus*

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Fúquene Media	Diego Alexander
Silva Merchán	Lorena

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Castañeda Gómez	Jhon Fredy

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Castañeda Gómez	Jhon Fredy
Valenzuela Rojas	Juan Carlos

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Licenciado en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

FACULTAD: Educación

PROGRAMA O POSGRADO: Licenciatura en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

CIUDAD: Neiva **AÑO DE PRESENTACIÓN:** 2022 **NÚMERO DE PÁGINAS:** 113

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas Fotografías Grabaciones en discos ___ Ilustraciones en general ___ Grabados ___ Láminas ___
Litografías ___ Mapas Música impresa ___ Planos ___ Retratos ___ Sin ilustraciones ___ Tablas o Cuadros



DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	2 de 3
--------	--------------	---------	---	----------	------	--------	--------

SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento:

MATERIAL ANEXO: Ninguno

PREMIO O DISTINCIÓN (En caso de ser LAUREADAS o Meritoria):

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
1. Cuantificación de Proteínas	Protein Quantification
2. Extracción de Veneno	Venom Extraction
3. Difusión en Agar	Agar Diffusion
4. Abejorros	Bumblebee
5. Agente Antimicrobiano	Antimicrobial Agent

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

La resistencia bacteriana se ha convertido en una gran problemática durante los últimos años ya que, los patógenos han mostrado cada vez más, menos susceptibilidad a los antibióticos. La especie *Bombus cf. atratus* es polinizadora de muchas pasifloras, sin embargo, su veneno no ha sido reportado en Colombia como un posible agente antimicrobiano. Por tal motivo, el objetivo de esta investigación fue extraer y evaluar el veneno del abejorro *Bombus* para determinar su potencial contra *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis*. Para esto, se construyó en primera instancia, hoteles-Trampa con el fin de atraer y coleccionar la mayor cantidad de individuos en el municipio de La Plata-Huila, en comparación con la colecta realizada en el municipio de La Argentina-Huila, sin el uso de estructuras maderables. Posteriormente, se extrajo el veneno mediante la técnica de separación de glándulas venenosas del cuerpo de los abejorros. Luego, las muestras se almacenaron en criotubos bajo nitrógeno líquido a -80°C , y de esta manera se sometieron al proceso de liofilización y su consecuente conservación a 0°C . La evaluación antimicrobiana fue realizada por el método de difusión en agar empleando los sensi-discos para observar la sensibilidad de las bacterias ya mencionadas contra el veneno. Adicionalmente, se cuantificaron las proteínas presentes en las muestras mediante la técnica de espectrofotometría UV. La evaluación antimicrobiana del veneno del *Bombus cf. atratus* mostró potencial inhibitorio contra *Staphylococcus aureus*, ya que se obtuvieron halos de inhibición de 9,30 mm a 159 ppm, pero en el caso de la bacteria Gramnegativa *Salmonella enteritidis* no mostró presencia de halos de inhibición.

ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

Bacterial resistance has become a major problem in recent years as pathogens have shown increasingly less susceptibility to antibiotics. The species *Bombus cf. atratus* is a pollinator of many passion flowers, however, its venom has not been reported in Colombia as a possible antimicrobial agent. Therefore, the objective of this



DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	3 de 3
--------	--------------	---------	---	----------	------	--------	--------

research was to extract and evaluate the venom of the *Bombus* bumblebee to determine its potential against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis*. For this purpose, first of all, hotel-traps were built in order to attract and collect the greatest number of individuals in the municipality of La Plata-Huila, in comparison with the collection carried out in the municipality of La Argentina-Huila, without the use of wood structures. Subsequently, the venom was extracted using the technique of separating venom glands from the bumblebees' bodies. Then, the samples were stored in cryotubes under liquid nitrogen at -80°C , and in this way were subjected to the freeze-drying process and consequent conservation at 0°C . The antimicrobial evaluation was performed by the agar diffusion method using the sensi-discs to observe the sensitivity of the aforementioned bacteria against the venom. Additionally, the proteins present in the samples were quantified by UV spectrophotometry. The antimicrobial evaluation of the *Bombus cf atratus* venom showed inhibitory potential against *Staphylococcus aureus*, since inhibition halos of 9.30 mm at 159 ppm were obtained, but in the case of the Gram-negative bacterium *Salmonella enteritidis*, no inhibition halos were present.

APROBACION DE LA TESIS

Nombre presidente Jurado: PhD. JHON FREDY CASTAÑEDA GÓMEZ

Firma:

Nombre Jurado: Carmen Helena Barragán

Firma:

Nombre Jurado: Claudia Milena Amorocho Cruz

Firma:



Licenciatura en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

**EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DEL VENENO DEL
Bombus cf atratus SOBRE LAS BACTERIAS *Salmonella enteritidis* Y
Staphylococcus aureus.**

Trabajo de Grado para obtener el Título de:

Licenciado en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

Presentan:

Diego Alexander Fúquene Medina

Lorena Silva Merchán

Asesor(es)

Jhon Fredy Castañeda Gómez

Juan Carlos Valenzuela Rojas

Neiva, Huila, Colombia

julio 2022

**EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DEL VENENO DEL
Bombus cf atratus SOBRE LAS BACTERIAS *Salmonella enteritidis* Y
Staphylococcus aureus.**

Por:

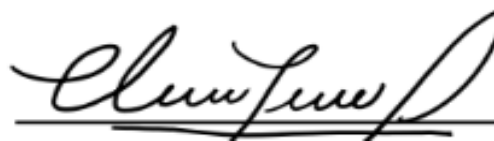
Diego Alexander Fúquene Media, Código: 20162150441

Lorena Silva Merchán, Código: 20162151371

Aprobado por los Jurados:



Dr. Carmen Helena Barragan



Dr. Claudia Milena Amorocho Cruz

Neiva, 5 de agosto de 2022

DEDICATORIA

Este trabajo se lo quiero dedicar especialmente a mi familia, por estar siempre a mi lado apoyándome a lograr mis sueños para brindarme la oportunidad de formarme como profesional.

A mi madre, la cual ha sido el pilar más importante y alguien que me ha sabido formar con unos buenos hábitos, valores y sentimientos y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional ayudándome a salir adelante.

A mis tios, Faiber, Harrinson y Eduardo los cuales han sido un apoyo paternal desde el inicio de mis estudios y quienes con su ayuda, cariño y comprensión han sido parte fundamental de mi vida.

A mis amigos, por mostrarme su aprecio en el transcurso de mi carrera universitaria, por compartir momentos de alegría, tristeza y sobre todo por demostrar que siempre se pueden lograr las cosas que tanto se anhela.

A mis maestros de la Universidad Surcolombiana, gracias por su tiempo, apoyo y por la sabiduría que me transmitieron en mi formación profesional.

Diego Alexander Fúquene Medina

Dedico este trabajo primeramente a mis padres, por ser un pilar muy importante y que han sabido formarme con buenos hábitos, valores y sentimientos, que con sus consejos me han guiado para culminar mi carrera profesional.

A mi hermano, con quien compartí muchos momentos valiosos, por darme su apoyo incondicional y por haber estado siempre presente en los momentos difíciles.

A mi tía Fabiola, por haber sido un apoyo económico fundamental durante estos años de estudio.

A mi pareja, quien siempre ha estado dispuesto a ayudarme en lo que necesite y ha sido una gran ayuda en el transcurso de este proceso de investigación.

A mis maestros de la Universidad Surcolombiana, gracias por su tiempo, enseñanza, y la sabiduría que me transmitieron en mi formación profesional.

A Diego Alexander, muchas gracias por su apoyo, dedicación, tiempo y sabiduría durante todos estos años que hicieron de esta experiencia muy especial y significativa.

Lorena Silva Merchán

AGRADECIMIENTOS

Al director de tesis Jhon Fredy Castañeda Gómez por el apoyo, estímulo y compañía para la realización de este trabajo de grado.

Al profesor Juan Carlos Valenzuela por el apoyo y compañía durante toda la investigación, además de la identificación, extracción y registro de las muestras de veneno del *Bombus* en el laboratorio de la Universidad Surcolombiana.

A la Coordinación del laboratorio de Química de Ciencias Básicas de la Universidad Surcolombiana a cargo de la Lic. Yeimis Yoana Montealegre Figueroa, por brindarnos los espacios y el respaldo para la ejecución metodológica del proyecto.

A los agricultores Luis Alberto Trochez Cerón y Jair Catuche Montilla por la prestación de los cultivos de sus passifloras.

A la microbióloga Bibian Arguello a cargo del laboratorio de microbiología de Ciencias Exactas de la Facultad de Educación de la Universidad Surcolombiana brindándonos el apoyo y la enseñanza.

A la Universidad Surcolombiana y sus maestros por la formación académica para obtener el título de Licenciado en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología.

A los jurados, como la Doctora Claudia Milena Amorocho y la Doctora Carmen Helena Barragan por sus aportes en las correcciones.

Tabla de contenido

Lista de Tablas	8
Lista de Figuras.....	8
Lista de Anexos.....	13
I. Resumen	14
II. Planteamiento del Problema.....	15
III. Justificación.....	16
IV. Objetivos	17
4.1. Objetivo General	17
4.2. Objetivos Específicos.....	17
V. Marco Teórico	18
5.1. Generalidades de la Familia <i>Apidae</i>	18
5.2. Género <i>Bombus</i>	19
5.3. Especie <i>Bombus atratus</i>	21
5.4. Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	23
5.5. Genero <i>Salmonella</i>	24
5.6. Especie <i>Salmonella enteritidis</i>	24
5.7. Familia <i>Staphylococcaceae</i>	25
5.8. Genero <i>Staphylococcus</i>	25
5.9. Especie <i>Staphylococcus aureus</i>	26
5.10. Antecedentes.....	27
5.10.1. <i>Internacionales</i>	27
5.10.2. <i>Nacionales</i>	37
5.11. Referentes Conceptuales	40
5.11.1. <i>Veneno de Bombus</i>	40
5.11.2. <i>Microorganismos: Bacterias</i>	40
5.11.3. <i>Agentes antimicrobianos</i>	41
5.11.4. <i>Método de difusión</i>	41
5.11.5. <i>Ensayos Biológicos</i>	42
5.12. Métodos de Análisis Instrumental.....	43
5.12.1. <i>Liofilización</i>	43
5.12.2. <i>Cuantificación de Proteínas</i>	43
VI. Metodología.....	44

6.1 Enfoque Metodológico	44
6.2. Construcción y mantenimiento de los hoteles	46
6.3. Extracción de hidrolato.....	48
6.4. Captura de los Abejorros y su identificación.....	50
6.5 Extracción de Glandulas	51
6.6. Extracción de veneno.....	52
6.7. Liofilización de las muestras.....	53
6.8. Ensayos Biológicos	55
6.8.1. <i>Preparación del Veneno</i>	55
6.8.2. <i>Preparación de los agares</i>	56
6.8.3. <i>Preparación del inocular</i>	59
6.8.4. <i>Estandarización del Inocular</i>	60
6.8.5 <i>Siembra de las bacterias</i>	62
6.8.6. <i>Observación de los resultados</i>	63
6.9 Cuantificación de Proteínas.....	64
VII. Resultados y Análisis.....	66
7.1. Resultados	66
7.1.1. Determinación taxonómica de la especie de abeja	66
7.1.2. <i>Extracción de las glándulas venenosas del Bombus cf atratus.</i>	71
7.1.4. <i>Recolección y determinación de la cantidad del veneno del Bombus cf atratus.</i>	74
7.1.5. <i>Liofilización del veneno del Bombus cf atratus.</i>	76
7.1.6. <i>Pruebas Biológicas</i>	77
7.1.7 <i>Cuantificación de las proteínas presentes en el veneno de La Plata-Huila y de La Argentina-Huila</i>	93
7.2. Discusión.....	95
VIII. Conclusiones.....	103
IX. Referencias	105
Anexos	113

Lista de Tablas

Tabla 1... <i>Revisiones internacionales relacionadas a las aplicaciones biológicas del veneno del genero Bombus</i>	27
Tabla 2... <i>Revisiones nacionales sobre las aplicaciones biológicas del veneno del genero Bombus</i>	37
Tabla 3... <i>Medidas taxonómicas de las especies de Bombus recolectadas de los municipios La Plata-Huila y La Argentina-Huila</i>	67
Tabla 4... <i>Ejemplares del municipio de La Plata-Huila</i>	71
Tabla 5... <i>Ejemplares del municipio de La Argentina-Huila</i>	72
Tabla 6... <i>Cantidad total obtenida del veneno de la especie Bombus cf atratus</i>	74
Tabla 7... <i>Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Salmonella enteritidis con el veneno del Bombus cf atratus del municipio de La Plata</i>	79
Tabla 8... <i>Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Salmonella enteritidis con el veneno del Bombus cf atratus del municipio de La Argentina</i>	81
Tabla 9... <i>Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Staphylococcus aureus con el veneno del Bombus cf atratus-del municipio de La Plata</i>	86
Tabla 10... <i>Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Staphylococcus aureus con la muestra del municipio de La Argentina</i>	89
Tabla 11... <i>Datos obtenidos para la cuantificación de las proteínas presentes en los venenos de La Plata y La Argentina</i>	93

Lista de Figuras

Figura 1... <i>Especimen de la familia Apidae</i>	18
---	----

Figura 2... <i>Individuo del genero Bombus realizando la polinización</i>	19
Figura 3... <i>Distribución de las especies de Bombus en Colombia</i>	20
Figura 4... <i>Especie Bombus atratus polinizando una flor</i>	21
Figura 5... <i>Diseño experimental para la obtención de los venenos de Bombus cf atratus</i>	46
Figura 6... <i>Posicionamiento de los hoteles</i>	47
Figura 7... <i>Mantenimiento de los hoteles</i>	48
Figura 8... <i>Secado de material vegetal</i>	49
Figura 9... <i>Montaje Hidrodestilación simple</i>	49
Figura 10... <i>Colecta de Abejorros</i>	50
Figura 11... <i>Identificación de los abejorros con estereoscopio Leica EZ4</i>	50
Figura 12... <i>Glándula de veneno con restos intestinales</i>	51
Figura 13... <i>Extracción del veneno con agujas de insulina</i>	52
Figura 14... <i>Liofilización del veneno mediante el Freeze Dryer</i>	53
Figura 15... <i>Disolución del veneno con ayuda del Vortex</i>	55
Figura 16... <i>Disoluciones preparadas a diferentes concentraciones</i>	56
Figura 17... <i>Preparación de los agares y de los materiales</i>	57
Figura 18... <i>Materiales llevados a autoclavar</i>	57
Figura 19... <i>Distribución de los agares en las cajas de Petri</i>	59
Figura 20... <i>Replica de las bacterias Salmonella enteritidis y S. aureus</i>	60
Figura 21... <i>Estandarización de los inoculos para Salmonella enteritidis y Staphylococcus aureus mediante la adición de solución salina a los tubos de ensayo</i> ...	61

Figura 22... <i>Estandarización de los inoculos de Salmonella enteritidis y S. aureus según la escala de McFarland</i>	61
Figura 23... <i>Siembra de los inoculos de Salmonella enteritidis y S. aureus en los agares de TSA y Muller-Hinton</i>	63
Figura 24... <i>Determinación de los resultados de las cajas de Petri con los sensi discos en Salmonella enteritidis y S. aureus</i>	64
Figura 25... <i>Montaje de una muestra depositada sobre el lector de un espectrofotómetro</i>	65
Figura 26... <i>Montaje en el laboratorio con el NanoDrop 2000c para realizar la cuantificación de las muestras de veneno</i>	65
Figura 27... <i>Especímenes capturados para realizar su respectiva identificación morfológica y taxonómica. (A) Abejorro proveniente del municipio de La Plata, (B) Abejorro proveniente del municipio de La Argentina</i>	69
Figura 28... <i>Taxonomía de la cabeza de los Bombus cf atratus y diferentes ángulos de la cabeza</i>	70
Figura 29... <i>Taxonomía de las alas y de las patas del Bombus cf atratus</i>	71
Figura 30... <i>Relación de los abejorros capturados del municipio de La Plata-Huila en función de las glándulas extraídas</i>	72
Figura 31... <i>Relación de los abejorros capturados del municipio de La Argentina-Huila en función de las glándulas extraídas</i>	73
Figura 32... <i>Cantidad del veneno obtenido en relación con el lugar de colecta</i>	75
Figura 33... <i>Veneno obtenido de la glandula de los abejorros</i>	76

Figura 34... <i>Curvas de temperatura de las muestras de veneno en relación a la temperatura de las bandejas</i>	76
Figura 35... <i>Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Salmonella enteritidis con el veneno del Bombus cf atratus del municipio de La Plata a concentraciones de 5 ppm</i>	78
Figura 36... <i>Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Salmonella enteritidis con el veneno del Bombus cf atratus del municipio de La Plata a concentraciones de 10 ppm</i>	78
Figura 37... <i>Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Salmonella enteritidis con el veneno del Bombus cf atratus del municipio de La Plata a concentraciones de 20 ppm</i>	79
Figura 38... <i>Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Salmonella enteritidis con el veneno del Bombus cf atratus del municipio de La Argentina a concentraciones de 10 ppm</i>	80
Figura 39... <i>Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Salmonella enteritidis con el veneno del Bombus cf atratus del municipio de La Argentina a concentraciones de 20 ppm</i>	81
Figura 40... <i>Relación de las concentraciones de las muestras del veneno de La Plata-Huila, los controles positivos y negativos, contra el tamaño de los halos de inhiación</i> ...	82
Figura 41... <i>Relación de las concentraciones de las muestras del veneno de La Argentina-Huila, los controles positivos y negativos, contra el tamaño de los halos de inhiación</i>	83

Figura 42... <i>Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Salmonella enteritidis con la muestra del municipio de La Plata y La Argentina a concentraciones de 44, 50 y 159 ppm</i>	84
Figura 43... <i>Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Staphylococcus aureus con el veneno del Bombus cf atratus del municipio de La Plata a concentraciones de 5 ppm</i>	85
Figura 44... <i>Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Staphylococcus aureus con el veneno del Bombus cf atratus del municipio de La Plata a concentraciones de 10 ppm</i>	85
Figura 45... <i>Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Staphylococcus aureus con el veneno del Bombus cf atratus del municipio de La Plata a concentraciones de 20 ppm</i>	86
Figura 46... <i>Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Staphylococcus aureus con la muestra del municipio de La Argentina a concentraciones de 10 ppm</i>	87
Figura 47... <i>Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Staphylococcus aureus con la muestra del municipio de La Argentina a concentraciones de 20 ppm</i>	88
Figura 48... <i>Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Staphylococcus aureus con la muestra del municipio de La Plata y La Argentina a concentraciones de 44, 50 y 159 ppm</i>	89
Figura 49... <i>Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para a) Salmonella enteritidis con el control positivo (Azitromicina) y b) Staphylococcus aureus con el control positivo (Amoxicilina) y control negativo (Solución de Ringer)</i>	90

Figura 50... <i>Relación de las concentraciones de las muestras del veneno de La Plata-Huila, los controles positivos y negativos, contra el tamaño de los halos de inhición ...</i>	91
Figura 51... <i>Relación de las concentraciones de las muestras del veneno de La Plata-Huila, los controles positivos y negativos, contra el tamaño de los halos de inhición ...</i>	92
Figura 52... <i>Cantidad de proteínas presentes en los venenos de los municipios de La Plata y de La Argentina.....</i>	94

Lista de Anexos

Anexo 1... <i>Certificado de Presentaciones al encuentro Departamental de Semilleros</i>	
.....	113

EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DEL VENENO DEL *Bombus cf. atratus* SOBRE LAS BACTERIAS *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus*.

I. Resumen

La resistencia bacteriana se ha convertido en una gran problemática durante los últimos años ya que, los patógenos han mostrado cada vez más, menos susceptibilidad a los antibióticos. La especie *Bombus cf. atratus* es polinizadora de muchas pasifloras, sin embargo, su veneno no ha sido reportado en Colombia como un posible agente antimicrobiano. Por tal motivo, el objetivo de esta investigación fue extraer y evaluar el veneno del abejorro *Bombus* para determinar su potencial contra *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis*. Para esto, se construyó en primera instancia, hoteles-Trampa con el fin de atraer y coleccionar la mayor cantidad de individuos en el municipio de La Plata-Huila, en comparación con la colecta realizada en el municipio de La Argentina-Huila, sin el uso de estructuras maderables. Posteriormente, se extrajo el veneno mediante la técnica de separación de glándulas venenosas del cuerpo de los abejorros. Luego, las muestras se almacenaron en criotubos bajo nitrógeno líquido a -80°C , y de esta manera se sometieron al proceso de liofilización y su consecuente conservación a 0°C . La evaluación antimicrobiana fue realizada por el método de difusión en agar empleando los sensi-discos para observar la sensibilidad de las bacterias ya mencionadas contra el veneno. Adicionalmente, se cuantificaron las proteínas presentes en las muestras mediante la técnica de espectrofotometría UV. La evaluación antimicrobiana del veneno del *Bombus cf. atratus* mostró potencial inhibitorio contra *Staphylococcus aureus*, ya que se obtuvieron halos de inhibición de 9,30 mm a 159 ppm, pero en el caso

de la bacteria Gramnegativa *Salmonella enteritidis* no mostró presencia de halos de inhibición.

II. Planteamiento del Problema

Muchos microorganismos han sido vectores de enfermedades tanto en plantas como en seres humanos de diferentes países gracias a su rápida reproducción. En Colombia, se ha registrado gran variedad de problemáticas causadas por bacterias, debido a la resistencia generada por este tipo de organismos a los antibióticos. En los últimos años, se han llevado a cabo investigaciones sobre la alta efectividad del veneno de especies del género *Apis*; sin embargo, se han realizado muy pocos estudios respecto a otros géneros pertenecientes a la familia *Apidae* como es el caso del género *Bombus*. Actualmente, en Colombia no se han encontrado estudios acerca del control de bacterias a partir del veneno proveniente del género *Bombus*. En consecuencia, es importante el descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos de origen natural a fin de contrarrestar la resistencia bacteriana por medio de investigaciones que permitan el aislamiento e identificación de venenos del género *Bombus*. Así mismo, es necesario efectuar investigaciones que permitan el aislamiento e identificación de venenos de especies de abejorros que se encuentran en el Huila y su evaluación ante diferentes microorganismos para crear conciencia en la comunidad huilense sobre el potencial medicinal del *Bombus*.

Por tal motivo, se plantea la siguiente pregunta problema:

¿Cuál es el potencial antimicrobiano del veneno de la especie *Bombus cf atratus* sobre las bacterias *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus*?

III. Justificación

La lista de la OMS se divide en tres categorías de acuerdo con la urgencia en que se necesitan los nuevos antibióticos por la resistencia que han generado a los existentes: prioridad crítica, alta o media. En el segundo nivel (alto) contienen bacterias que exhiben una farmacorresistencia creciente y provocan enfermedades comunes como la gonorrea, entre otras. Dentro de esta categoría se encuentran los patógenos *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis* (Lawe y Bennett, 2017). La especie *Staphylococcus aureus* es una bacteria grampositiva con una gran capacidad de infección ya que, existen múltiples variaciones. A menudo provocan infecciones en la piel, neumonía, infecciones óseas e infecciones de las válvulas cardíacas, (Bush, 2015). La bacteria se propaga de persona a persona por un contacto directo, incluso a través de objetos contaminados o por inhalación de gotas infectadas que se dispersan al toser o estornudar (Pasachova, et.al., 2019).

De igual manera, la infección por *Salmonella enteritidis* afecta el intestino provocando diarrea, fiebre y náuseas. Se puede transmitir a través de contacto directo con las bacterias en las heces o indirectamente por alimentos o agua contaminada (Alfaro, 2018).

A partir de lo anterior, se hace necesario descubrir nuevas alternativas para combatir estos microorganismos permitiendo minimizar la tasa de afectación en los seres humanos. Por tal motivo, en esta investigación se trabajó con el *Bombus cf atratus*, especie polinizadora, vital para que muchas pasifloras fructifiquen, dado que los adultos llegan a las flores en busca de los hidratos de carbono que ofrece el néctar, y así

mantiene la salud y fertilidad del suelo, (Abrahamovich y Díaz, 2007). Estas especies tienen mayor capacidad de trabajo que las abejas ya que pueden visitar mayor número de flores y transportar gran cantidad de polen por su mayor superficie de contacto con los estambres y pistilos. Están menos influenciados por el clima y trabajan durante más tiempo (Abrahamovich y Díaz, 2007).

De esta manera, se espera que los resultados permitan determinar el potencial medicinal de los venenos de abejorros como especies polinizadoras tanto a nivel regional como a nivel nacional. Por otra parte, este es el primer trabajo de investigación en el grupo y en el semillero, que permitirá abrir la línea sobre el estudio de venenos de animales y su potencial antimicrobiano.

IV. Objetivos

4.1. Objetivo General

- Extraer y evaluar la actividad antimicrobiana del veneno del *Bombus cf atratus* sobre las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis*.

4.2. Objetivos Específicos

- Analizar la efectividad de los hoteles trampa para la captura de abejorros *Bombus cf atratus* previamente clasificados.
- Extraer el veneno del *Bombus cf. atratus*.
- Determinar el potencial antimicrobiano del veneno de *Bombus cf atratus* contra las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis*.
- Cuantificar las proteínas presentes en el veneno.

V. Marco Teórico

5.1. Generalidades de la Familia *Apidae*

Figura 1

Espécimen de la familia Apidae.



Nota. Tomado de (O'Toole y Raw, 1999)

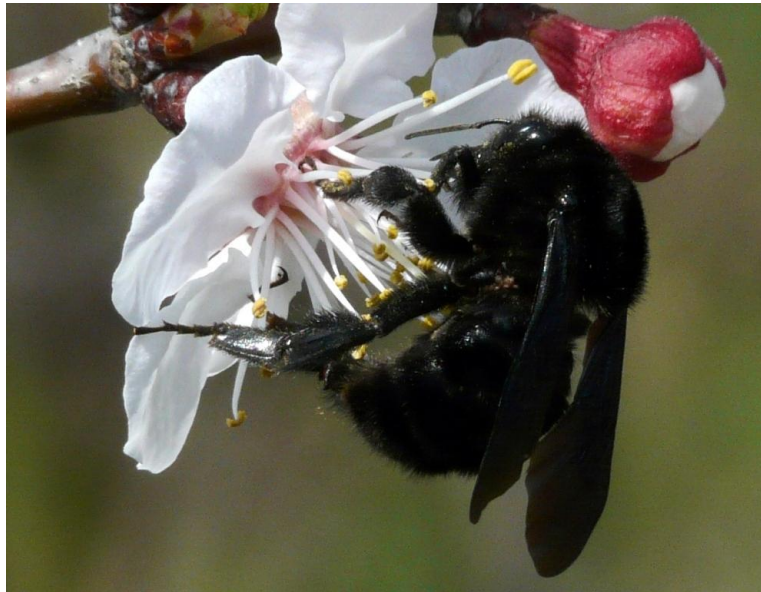
La Familia *Apidae* es muy importante a nivel mundial, ya que son grandes polinizadores de especies vegetales (Aguado, *et. al*, 2017). Esta familia comprende un gran número de subespecies dentro de las cuales se encuentran las abejas y los abejorros (figura 1). La mayor parte de sus hembras poseen una corbícula en sus patas posteriores preparadas para la recogida y transporte de polen (Aguado, *et. al*, 2017). Esta familia se diferencia por incluir insectos eusociales que cooperan con el cuidado de las crías, su organización en castas está perfectamente definida (Aguado, *et. al*, 2017, pp. 273-275).

La familia *Apidae* incluye más de 200 géneros, los cuales abarcan más de 1000 especies, según Parra y Nates, (2007) “*ocupan diversos hábitats de extensas áreas de bosques neotropicales debido a que pueden encontrar en estos los recursos necesarios para cubrir sus exigencias de nidificación y alimentación*”.

5.2. Género *Bombus*

Figura 2.

Individuo del genero Bombus realizando la polinización.



Nota. Tomado de (González, 2011)

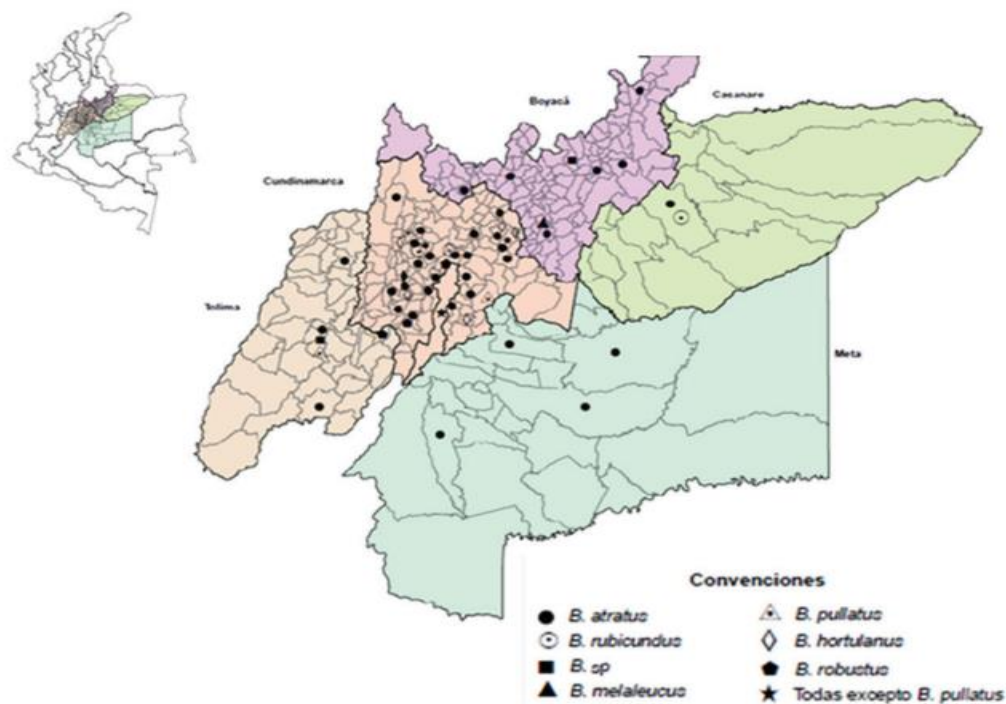
El género *Bombus* según lo expuesto por Pinilla, *et. al*, (2016) “*tiene cerca de 250 especies en el mundo, distribuidas principalmente en Asia y Norteamérica debido a su origen holártico*” (pp.2). En Colombia, este genero está siendo amenazado por la pérdida del hábitat, debido al auge de la urbanización, a la perdida de la vegetación en los humedales, a la destrucción en los páramos, por las practicas inadecuadas de manejo de flora y por el uso intensivo de insecticidas y herbicidas en actividades agrícolas para

la destrucción de las malezas, que a su vez hacen parte de la flora que brinda los recursos de néctar y polen, siendo estos la base de la alimentación para el *Bombus*; (Téllez y Posada, 2013 pp. 2)

El género *Bombus* está compuesto por abejas eusociales grandes de 1,5 cm – 3,5 cm, robustas y con abundante pilosidad (figura 2). Las alas anteriores tienen tres celdas submarginales, espuelas tibiales posteriores presentes, ojos glabros, con presencia de corbícula en las hembras, mandíbula con dientes apicales cortos y romos y espacio malar largo; (Pinilla, *et. al*, 2016 pp. 2)

Figura 3.

Distribución de las especies de Bombus en Colombia.



Nota. Tomado de (Téllez y Posada, 2013)

5.3. Especie *Bombus atratus*

Figura 4.

Especie Bombus atratus polinizando una flor.



Nota. Tomado de (Olejnik, 2014)

Bombus atratus es una especie muy abundante gracias a su capacidad de tolerar diferentes climas y altitudes (figura 3). En los últimos años, los abejorros se han utilizado cada vez más en la agricultura como polinizadores ya que pueden polinizar una mayor gama de especies de plantas, a través de la polinización por zumbido (Reynaldi, *et. al*, 2013). Sin embargo, al transportar los abejorros por todo el mundo, ha dejado como consecuencia, la propagación de patógenos de los abejorros que se escapan de las instalaciones del invernadero (Reynaldi, *et. al*, 2013).

Según (Ascher y Pickering, 2020) “*El abejorro negro Bombus atratus es una especie originaria de Sudamérica, un himenóptero de la familia Apidae*”. “*Es una*

especie polinizadora de plantas como tomate por lo que en invernaderos se logra obtener frutos más grandes, pesados y homogéneos en su forma” (Aldana, *et. al*, 2007).

En cuanto a la actividad de este abejorro, se tiene que la mayor actividad forrajera de *B. atratus* es en las zonas frías como La Valvanera (Chía, Cundinamarca), es entre las 10:00 y las 14:00 horas (Kwon y Saeed, 2003). En época seca, el comportamiento de *B. atratus* es similar al de la época de lluvias, presentando dos picos de actividad, antes del mediodía, entre las 10:00 y 11:00 h, a una temperatura cercana a los 18°C. El segundo pico de actividad es después del mediodía, a temperaturas promedio que oscila entre los 19,35 °C y 20,35 °C. A partir de los 19 °C, la actividad de *B. atratus* disminuye por lo que se infiere que, a temperaturas superiores a los 19 °C, no se favorece la actividad. Aun así, es una especie polinizadora muy tolerante a cambios de temperatura (Kwon y Saeed, 2003).

Dentro de su reproducción, las colonias de *B. atratus* duran hasta dos años, dando lugar a dos generaciones de sexuados por parte de la reina parental (Padilla, *et. al*, 2020). Las especies de regiones templadas finalizan su ciclo en primavera y en otoño inicia un nuevo ciclo con las reinas jóvenes que han salido de su diapausa (Padilla, *et. al*, 2020).

Respecto a su morfología, *B. atratus* es una especie variada cromáticamente, con formas enteramente negras (melánicas) hasta combinadas con pilosidad amarilla (flavínicas) en el mesosoma y metasoma. Así mismo, posee alas oscuras, de color castaño en toda la superficie, con algunos reflejos violáceos (Abrahamovich y Díaz, 2007). En *B. atratus* se puede observar distintos grados de flavinización: desde

ejemplares con pilosidad amarilla extendida a la porción eposternal superior y parte o todo: tergos metasomales 1, 2 y 4 (T1, T2, T4) (figura 4). En obreras y machos la coloración tiene un patrón similar a la reina, a excepción de las alas que son generalmente más claras (Abrahamovich y Díaz, 2007).

La cabeza de este organismo mide 4,15 mm de largo por 3,93 mm de ancho; el ancho del mesosoma mide 4,7 mm; el ancho del metasoma 6 mm y el ala anterior, 11,68 mm de largo y 4,35 mm de ancho (Abrahamovich y Díaz, 2007).

Las familias de plantas asociadas con *B. atratus* son, *Asteraceae*, *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Rosaceae*, *Convolvulaceae*, *Passifloraceae* y *Rutaceae*, entre otras (Abrahamovich y Díaz, 2007)

5.4. Familia *Enterobacteriaceae*

Esta familia comprende un grupo heterogéneo y extenso de bacilos Gram negativos cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano y de los animales. Dentro de los géneros más comunes se destacan: *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter* y otros más. Algunos microorganismos entéricos, por ejemplo, *Escherichia coli*, son parte de la microflora normal y en forma incidental producen enfermedad, en tanto que otros, las salmonelas y las shigelas, por lo regular son patógenos para el ser humano.

Las Enterobacterias son anaerobias o aerobias facultativas, fermentan una amplia gama de hidratos de carbono, poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas y otros factores de virulencia; (Brooks, *et. al.*, 2011 pp. 213).

5.5. Genero *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece al grupo de las enterobacterias móviles con flagelación peritrica no pertenecientes al grupo de coliformes, ya que no son capaces de fermentar la lactosa, no producen desaminasas y tienen un carácter mas o menos patógenos dependiendo de sus especies. Son bacterias Gram negativas, en forma bacilar y en general sus especies provocan infecciones febriles de carácter entérico, tipo gastroenteritis, enterocolitis o inclusive fiebres tifoideas o paratifoideas (Granados y Villaverde, 2003 pp. 107)

La *salmonella* tiene un interés clínico que estriba en su efecto patógeno, son dependientes de la presencia de antígenos estructurales, así como la formación de sustancias toxicas. En este genero el antígeno de la pared celular, que se presentan especialmente en las especies de *S. typhi* y *S. paratyphi*, les confiere un poder protector frente a los ácidos. Las especies del genero *Salmonella* actúan en su mayoría originando efectos patógenos al hombre (Granados y Villaverde, 2003 pp. 107)

5.6. Especie *Salmonella enteritidis*.

La *Salmonella enteritidis* es un bacilo Gram negativo que, en la actualidad abarca cerca de 2700 serovares, ya que son móviles gracias a la presencia de flagelos peritricos, (Ministerio de la Protección Social Instituto Nacional de Salud UERIA, 2011, pp. 17).

Debido a la diversidad de los serovares identificados, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto una clasificación basada en las combinaciones de los antígenos que posee somático (O), flagelar (H) y capsular (K), debido a que es

pertenece al sistema de Kauffman-White, (Ministerio de la Protección Social Instituto Nacional de Salud UERIA, 2011, pp. 17)

La *Salmonella enteritidis* tiene una temperatura óptima de crecimiento, entre los 35-37°C, sin embargo, estos datos no son concluyentes ya que dependen del serovar y el medio de cultivo en donde se inoculan. Tiene un pH que varía entre los 4-9, con una tolerancia a los ácidos dependiendo del medio al cual se exponga el microorganismo. (Ministerio de la Protección Social Instituto Nacional de Salud UERIA, 2011, pp. 19).

5.7. Familia *Staphylococcaceae*

La familia *Staphylococcaceae* comprende un gran grupo de microorganismos, los cuales están presentes en la piel y mucosas de seres humanos. Dentro de esta familia existe un amplio género (*Staphylococcus*), en el cual existe un gran número de especies, siendo las más importantes desde el punto de vista clínico: *S. aureus* y *S. epidermidis*. Su morfología se caracteriza por ser cocos Gram positivos, asociados en racimos irregulares, siendo similares a un racimo de uvas, carecen de flagelos, no forman esporas y son aerobios y anaerobios facultativos. La presencia de estas bacterias en los alimentos indica una contaminación introducida por prácticas inadecuadas en la manipulación o materia prima contaminada, (Frágenas, *et. al*, 2017, pp. 2).

5.8. Género *Staphylococcus*

El género *Staphylococcus* por lo general está compuesto por varias especies, muchas de las cuales se pueden encontrar en nuestras clínicas humanas. Los estafilococos son cocos gram positivos, no móviles, que no forman esporas, catalasa

positivos. Estos microorganismos se acomodan como células simples, en pares, en tétradas y en cadenas cortas, pero aparecen en forma predominante en grupos como racimos. La mayoría de las especies son anaerobios facultativos, excepto *S. aureus* y *S. saccharolyticus*. Estas dos especies crecen de forma anaerobia y a diferencia de las especies facultativas, a menudo son catalasas negativas. Los estafilococos se encuentran por lo general en la piel y las mucosas de seres humanos y otros animales; (Winn, *et. al*, 2006 pp. 595)

5.9. Especie *Staphylococcus aureus*

La especie *Staphylococcus aureus* es una bacteria muy resistente al medio ambiente y ampliamente distribuida en la naturaleza que puede encontrarse en el aire, residuos, maquinaria y superficies de la industria alimentaria, pero su principal reservorio son los animales y humanos, encontrándose en la piel, cabello, fosas nasales y garganta. Es una de las bacterias patógenas humanas formadores de toxinas más resistentes y puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo en un ambiente seco y son muy persistentes en alimentos con contenido alto en sales y azúcares; (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2013 pp. 1)

Es una bacteria patogénica Gram positiva, anaerobia facultativa, no es formadora de esporas y catalasa positiva, crecen en racimos en forma de uvas y pueden formar biopelículas en la superficie de procesamiento de alimentos. La temperatura de crecimiento varía de 7 a 48° C, siendo la óptima a 37° C y con un rango de pH de 4-10, siendo la más adecuada de 6 a 7; (Wirtanen y Salo, 2016 pp. 8).

5.10. Antecedentes

En este apartado se incluyen algunos de los estudios más relacionados con la obtención, extracción y aplicaciones biológicas del veneno aislado del género *Bombus*, publicados en la literatura científica. Además, se presenta una amplia revisión con algunos estudios que datan del año 2000 hasta el año 2021.

5.10.1. Internacionales.

5.10.1.1. Algunas Revisiones Internacionales.

Tabla 1.

Revisiones internacionales relacionadas a las aplicaciones biológicas del veneno del genero Bombus

Título	Objetivos	Metodología	Principales hallazgos	Conclusiones
Cloning and characteristics of the antibacterial peptide gene abaecin in the bumblebee <i>Bombus lantschouensis</i> (Hymenoptera: Apidae)	Clonar el gen completo de la abaecina del abejorro <i>Bombus lantschouensis</i> y analizar sus perfiles de expresión en diferentes tejidos, etapas de desarrollo y estados reproductivos	Se tomaron muestras de diferentes tejidos de 6 reinas ponedoras. Se tomaron también muestras de las distintas fases de desarrollo. Se eliminó el ADN genómico	Se demostró que <i>Bombus ignitus</i> era la especie más cercana a <i>B. lantschouensis</i> con base en la secuencia de la proteína putativa Abaecin. La abaecina se expresó en diferentes tejidos,	El gen abaecina desempeña un papel importante en el desarrollo, la reproducción y las respuestas inmunitarias de los abejorros. Durante la cría artificial de abejorros, debe crearse un buen entorno para

<p>(Wang, <i>et. al</i>, 2021)</p>	<p>mediante RTqPCR. Probar las respuestas de la abaecina a una bacteria (<i>Escherichia coli</i>) y a un hongo (<i>Beauveria bassiana</i>).</p>	<p>y se utilizó 1 µg de ARN total como plantilla para la transcripción inversa. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 42 °C durante 2 min, 37 °C (15 min) y 85 °C (5 s). Se hizo la clonación molecular de la abaecina y su detección cuantitativa por RT-PCR. Para comprobar la respuesta de la abaecina a las infecciones bacterianas y fúngicas, se utilizaron <i>E. coli</i> y <i>B. bassiana</i> para infectar a 48</p>	<p>mayoritariamente en los cuerpos grasos y muy poco en las antenas. Así mismo, se detectó una baja expresión de la abaceína en los huevos y las larvas, y una alta expresión en los estados de pupa. La expresión más alta se observó en el estadio de pupa Pw y la expresión disminuyó después desde los estadios Pp hasta el Pdd. Además, la expresión de la abaecina era mayor en las hembras de abejorros que ponían huevos.</p>	<p>evitar la infección por bacterias u hongos.</p>
------------------------------------	---	---	---	--

		obreras de abejorros.	Tanto las infecciones por <i>E. coli</i> como por <i>B. bassiana</i> indujeron la expresión de abaecina.	
Molecular cloning and antifungal activity of an inhibitor cysteine knot peptide from the bumblebee <i>Bombus ignitus</i> . (Park, <i>et. al</i> , 2016)	Obtener información sobre la clonación molecular y la actividad antifúngica del péptido ICK del abejorro (<i>Bombus ignitus</i>) (BiICK).	Primero se hizo la clonación del cDNA y análisis de la secuencia. Luego, se extrajo el ARN y se llevó a cabo el análisis de northern blot. El biICK recombinante se produjo utilizando un sistema de expresión de baculovirus. El BiICK recombinante purificado se utilizó para	Se identificó un BiICK que contiene un pliegue ICK. El BiICK se expresó en la epidermis, el cuerpo graso y la glándula del veneno de las abejas obreras <i>B. ignitus</i> . Los péptidos BiICK recombinantes se unieron directamente a <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Ascospaera apis</i> y <i>Fusarium graminearum</i> , pero no se	Se demuestra que BiICK actúa como un péptido antifúngico.

		comprobar la actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos mediante un ensayo de inhibición del crecimiento en líquido.	unieron a <i>Escherichia coli</i> , <i>Paenibacillus larvae</i> o <i>Bacillus thuringiensis</i> . El BiICK mostró actividad antifúngica contra los hongos.	
Unraveling the venom proteome of the bumblebee (<i>Bombus terrestris</i>) by integrating a combinatorial peptide ligand library approach with FT-ICR MS (Van Vaerenbergh, <i>et. al</i> , 2015)	Realizar el análisis proteómico en profundidad de la composición del veneno del <i>Bombus terrestris</i> .	El veneno de 75 abejorros se agrupó hasta alcanzar una concentración de proteínas de 69,54 mg/ml. Se hizo el análisis por espectrometría de masas. Todas las identificaciones de proteínas se fusionaron en una lista y se eliminaron todos los	Se identificaron 57 compuestos. El 72% de los compuestos detectados tenían un homólogo en el veneno de abeja. Ambos venenos contienen una selección de toxinas específicas de cada especie, lo que revela distintos efectos dañinos que pueden haber evolucionado en	Se encontraron 57 compuestos del veneno, que pudieron clasificarse según sus supuestas funciones. Se encontraron muchos homólogos del veneno de abejas y abejorros 86 M. Los trabajadores de los invernaderos están más expuestos a las

		<p>identificadores dobles.</p> <p>Posteriormente, se ejecutó un análisis bioinformático de los compuestos identificados.</p>	<p>respuesta a atacantes específicos de cada especie.</p> <p>Además, este estudio amplía la lista de posibles alérgenos del veneno.</p>	<p>picaduras de abejorros y a menudo desarrollan alergia al veneno.</p>
<p>Molecular cloning and antibacterial activity of bombolitin isolated from the venom of a bumblebee, <i>Bombus terrestris</i>. (Qiu, <i>et. al</i>, 2012)</p>	<p>Realizar la clonación molecular de la bombolitina aislada del veneno de un abejorro, <i>Bombus terrestris</i>, y demostrar su actividad antibacteriana.</p>	<p>Se realizó la clonación de genes. Se recogió de sacos de veneno disecados de abejas obreras para hacer la purificación de la bombolitina y SDS-PAGE. Se prosiguió con el análisis de Northern blot. Se probó la actividad antibacteriana de la Bt-Bombolitina</p>	<p>El análisis comparativo muestra que la bombolitina madura de <i>B. terrestris</i> consta de 18 residuos de aminoácidos, que son idénticos a los de la bombolitina de <i>B. ignitus</i>. La bombolitina de <i>B. terrestris</i> mostró actividad antibacteriana tanto contra la bacteria Gramnegativa <i>Klebsiella</i></p>	<p>La bombolitina de <i>B. terrestris</i> puede ser un potencial agente antimicrobiano.</p>

		<p>purificada del veneno de <i>B. terrestris</i> contra la bacteria Gramnegativa <i>Klebsiella pneumoniae</i> y la bacteria Grampositiva <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p><i>pneumoniae</i> como contra la bacteria Grampositiva <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	
<p>Bioactivity and molecular characterization of bombolitins from <i>Bombus ardens</i>, <i>B. consobrinus</i>, <i>B. terrestris</i> and <i>B. ussurensis</i>. (Yoon, <i>et. al</i>, 2017)</p>	<p>Examinar las actividades biológicas de las bombolitinas de <i>Bombus ardens</i>, <i>B. consobrinus</i>, <i>B. terrestris</i> y <i>B. ussurensis</i> (bombolitinas A, C, T y U, respectivamente) mediante ensayos de actividad hemolítica, antimicrobiana, antifúngica y antitumoral.</p>	<p>Las secuencias de aminoácidos deducidas de las bombolitinas A, C, T y U se obtuvieron a partir de los datos del transcriptoma de los venenos de <i>B. ardens</i>, <i>B. consobrinus</i>, <i>B. terrestris</i> y <i>B. ussurensis</i>. Se hizo la alineación de secuencias de aminoácidos y</p>	<p>La bombolitina T mostró las mayores actividades hemolítica y antitumoral. Todas las bombolitinas mostraron una fuerte actividad antimicrobiana y antifúngica, y la bombolitina A poseía la mayor actividad antimicrobiana contra la bacteria Gramnegativa</p>	<p>Este estudio proporciona nueva información sobre las propiedades de los péptidos antitumorales de los venenos de los abejorros y los enfoques básicos para las herramientas de diseño de péptidos para la reducción de la citotoxicidad.</p>

		<p>PCA. Para el ensayo de actividad hemolítica se utilizaron glóbulos rojos humanos. Para el ensayo de actividad antimicrobiana y antifúngica de las bombolitinas sintetizadas se emplearon:</p> <p><i>Escherichia coli</i> gramnegativa, <i>Staphylococcus aureus</i> grampositivo, levadura grampositiva <i>Candida albicans</i> y moho gris <i>Botrytis cinerea</i>.</p> <p>Se utilizó una línea celular de</p>	<p><i>Escherichia coli</i>.</p> <p>Las cuatro bombolitinas tenían más de un 61,7% y un 45,5% de α-helicidad en tampones de dodecilsulfato de sodio 30 mM y trifluoroetanol al 50%. La bombolitina T mostró los valores más bajos de IC₅₀ de 8,5 μM y 8,8 μM contra las líneas celulares, pero su actividad hemolítica relativa a una concentración de 200 μM fue 2,3 veces mayor que la del Tritón X-100 al 0,1%. La menor actividad hemolítica se</p>	
--	--	--	--	--

		<p>adenocarcinoma de ovario humano y una línea celular de adenocarcinoma de ovario humano resistente a los fármacos para los ensayos antitumorales. Seguidamente se llevó a cabo la caracterización del espectro de dicroísmo circular. Para analizar los factores que afectan a la actividad hemolítica, se modificaron las propiedades estructurales de la bombolitina T. Se finalizó</p>	<p>observó con la adición de un aminoácido hidrofóbico (Ile14) al extremo C-terminal, así como con la sustitución de Ser10 y Leu12 por un aminoácido hidrofóbico (Leu) y un aminoácido cargado positivamente (Lys), respectivamente. Este hallazgo implica que la sustitución equilibrada de aminoácidos hidrofóbicos y cargados positivamente podría afectar a la citotoxicidad.</p>	
--	--	---	---	--

		con un análisis estadístico.		
Molecular cloning of the <i>Bombus terrestris</i> bumblebee venom protein phospholipase A ₂ and its anti-leukemia effects on K562 cells. (Qiu, <i>et. al</i> , 2017)	Clonar el ADNc de la fosfolipasa A ₂ (Bt PLA ₂) y purificar una forma madura de Bt-PLA ₂ a partir del veneno de abejorro (<i>Bombus terrestris</i>). Evaluar las actividades de inducción de la diferenciación y la apoptosis de la Bt-PLA ₂ en las células K562 de la leucemia mielógena crónica (LMC).	Se adquirieron los abejorros, reactivos y cultivo celular. Luego, se realizó la clonación de genes y análisis de secuencias. Se purificó la Bt-PLA ₂ y SDS-PAGE. Más tarde, se llevó cabo la proliferación celular, el análisis de la actividad de diferenciación celular de Bt-PLA ₂ y el estudio morfológico de las células apoptóticas.	La forma purificada y madura de Bt-PLA ₂ es una proteína de 18 kDa, e inhibía el crecimiento de las células K562, determinado por un valor IC ₅₀ de 29,5 ng/μl. Además, la Bt-PLA ₂ indujo la diferenciación eritroide de las células K562 de forma dependiente de la dosis, y esto se complementó con la regulación al alza de la expresión del ARNm de la glicoforina A (GPA). Se	Se demostró el uso potencial de la Bt-PLA ₂ como pista farmacológica contra la leucemia.

		Se analizó la citometría de flujo y Western blot.	demonstró que la Bt-PLA2 indujo la apoptosis principalmente a través de la vía Akt.	
Molecular cloning and antimicrobial activity of bombolitin, a component of bumblebee <i>Bombus ignitus</i> venom. (Choo, <i>et. al</i> , 2010)	Describir la clonación molecular y la actividad antimicrobiana de la bombolitina aislada del veneno del abejorro <i>Bombus ignitus</i> .	Se inició con la purificación de la bombolitina, SDS-PAGE y secuenciación N-terminal. Seguidamente, se realizó la clonación de genes y el análisis de Northern blot. Finalmente, se hicieron los ensayos antibacteriano y antifúngico.	La bombolitina de <i>B. ignitus</i> mostró una elevada actividad antibacteriana contra dos bacterias Grampositivas y dos Gram-negativas. Además, la bombolitina de <i>B. ignitus</i> mostró actividad antifúngica contra los hongos fitopatógenos <i>Fulvia fulva</i> y <i>Alternaria radicina</i> .	Estos resultados sugieren que la Bi-bombolitina es un potencial agente antimicrobiano.

<p>Cloning and expression profiling of four antibacterial peptide genes from the bumblebee <i>Bombus ignitus</i>. (Choi, <i>et. al</i>, 2008)</p>	<p>Clonar cuatro genes de péptidos antibacterianos (apidaecina, himenoptaecina, abaecina y defensina) del abejorro <i>Bombus ignitus</i>. Secuenciar y caracterizar los ADNc y sus estructuras genómicas.</p>	<p>Los abejorros, <i>B. ignitus</i> se criaron en condiciones artificiales. Se hizo el cribado de bibliotecas de ADNc, secuenciación de nucleótidos y análisis de datos. Se prosiguió con el aislamiento del ADN genómico y PCR de los genes de los péptidos antibacterianos. Se finalizó con la inyección de PBS o lipopolisacárido (LPS).</p>	<p>Los cuatro péptidos antibacterianos de <i>B. ignitus</i> tenían características similares a las de otros péptidos antibacterianos de abejas. Además, estos péptidos fueron inducidos de forma aguda y similar por la inyección de PBS o la estimulación de LPS</p>	<p>Los péptidos antibacterianos de varias clases se expresan simultáneamente en un mismo insecto tras una infección o lesión.</p>
---	---	---	---	---

5.10.2. Nacionales

5.10.2.1. Algunas Revisiones Nacionales.

Tabla 2.

Revisiones nacionales sobre las aplicaciones biológicas del veneno del genero Bombus

Titulo	Objetivos	Metodología	Principales hallazgos	Conclusiones.
Bee pathogens found in <i>Bombus atratus</i> from Colombia: A case study (Gamboa, et. al, 2015)	Capturar abejorros <i>Bombus atratus</i> para detectar conjunto de patógenos de abejas.	Se colectó la muestra de abejorros que se congelaron. El ARN fue aislado y el ADN extraído de cada individuo, se retro transcribió el ARN y se clonó el ADN. Las muestras se analizaron para detectar la presencia de bacterias, microsporidios, protistas y virus.	Todos los abejorros analizados se encontraron infectados por al menos cuatro especies diferentes de patógenos los cuales fueron considerados multihuéspedes. Se descubrió la neogregarina A. bombi en <i>Bombus atratus</i> . Se amplificó regiones ITS y se encontró similitudes de secuencia con varios haplotipos de A. bombi.	Existe la necesidad de más marcadores moleculares, con controles de regiones sin transporte de abejas, para calcular primeramente la tasa de mutación molecular.
Efecto letal agudo de los insecticidas	Determinar la dosis letal media aguda (LD ₅₀) de	Se criaron 101 colonias de <i>B. atratus</i> en	Las LD ₅₀ para Imidacloprid, contactos y oral	El cociente de peligrosidad (HQ) y el índice

<p>en formulación comercial. (Riaño y Cure, 2016)</p>	<p>formulaciones comerciales de los insecticidas Imidacloprid. Spinosad y Thiocyclam hidrogenooxalato, ampliamente utilizados en Colombia, para el control de diversas plagas de importantes cultivos.</p>	<p>cautiverio. La DL₅₀ se realizó por vía oral y por contacto, siguiendo y modificando las guías de la EPPO y la OCDE para realizar la DL₅₀ en <i>A. mellifera</i>. Se evaluaron cinco dosis por cada vía e insecticida, en un total de 25 trabajadores medianos por cada dosis y por duplicado. La mortalidad se registró a las 24, 48 y 72 horas después del experimento; y los datos se analizaron con el modelo de regresión Probit.</p>	<p>fueron de 0,048 µg/abeja y 0,010 µg/abeja, respectivamente. Para el oxalato de hidrógeno de tiociclam, la LD₅₀ tópica y oral fue de 0,244 µg/abeja y 0,056 µg/abeja, respectivamente. Para Spinosad, la LD₅₀ oral correspondió a 0,28 µg/abeja; no fue posible establecer el LDSO para la ruta de contacto.</p>	<p>de toxicidad relativa indicaron que los tres ingredientes activos son altamente tóxicos. En consecuencia, hay un gran riesgo del uso de insecticidas sobre <i>B. atratus</i>, considerando su naturaleza química.</p>
---	--	--	--	--

5.11. Referentes Conceptuales

En este apartado se presentan algunos principios básicos sobre el veneno de *Bombus*, microorganismos como las bacterias, agentes antimicrobianos y métodos de difusión.

5.11.1. Veneno de *Bombus*

La importancia de la picadura de los himenópteros se debe, en primer lugar, a la naturaleza agresiva del propio veneno, que puede causar irritación en los tejidos que penetra. En caso de infección, provocará reacciones cutáneas irritantes y, en segundo lugar, reacciones alérgicas, a veces muy graves (Álvarez, 2021).

Los *Bombus* son insectos que viven en grupos organizados y forman colmenas, hormigueros o avisperos. Su veneno es un compendio de sustancias farmacológicas y biológicamente activas entre las que se encuentran enzimas, aminos y péptidos, donde cada uno de los cuales juega un papel fundamental, y solo una parte de ellos es responsable de las reacciones alérgicas (Álvarez, 2021). Las alergias producidas, se pueden desencadenar de dos maneras: una es por picadura, la otra es por aspirar cerca de la colmena, inhalando el polvillo que se cae de las alas, especialmente de las abejas, que repetidamente entrarán en contacto y afectarán a las personas, como los apicultores (Álvarez, 2021).

5.11.2. Bacterias Patógenas

Los microorganismos que causan enfermedades en los seres vivos están en constante evolución, lo que representa un desafío en la búsqueda de tratamientos

efectivos contra ellos. Aunque existen varias alternativas farmacológicas que, en ocasiones, son ineficaces para controlar las enfermedades infecciosas, especialmente porque los patógenos han generado múltiples mecanismos de resistencia frente a ellos (Olascoaga, *et. al*, 2018).

5.11.3. Agentes antimicrobianos

La resistencia a los antibióticos es una de las principales amenazas actuales para la salud humana y cada año las bacterias resistentes a múltiples fármacos infectan a millones de personas en todo el mundo, y muchas mueren como resultado de su letalidad (Rončević, *et. al*, 2019). Así, desde su descubrimiento, hace unos 40 años, los péptidos antimicrobianos (AMP) de defensa innata han sido aclamados como una alternativa potencial a los antibióticos convencionales, debido a su potencial relativamente bajo para provocar resistencia (Rončević, *et. al*, 2019). Los (AMP) son moléculas efectoras multifuncionales, a menudo codificadas por genes, producidas por casi todos los organismos, y que tienen una actividad antimicrobiana directa y propiedades inmunomoduladoras (Rončević, *et. al*, 2019).

5.11.4. Método de difusión

El antibiograma disco-placa se encuentra basado en el trabajo hecho por Bauer, Kirby y colaboradores, siendo uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. Este método consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo de estudio, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. En el

momento en que el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe el agua y el antibiótico se difunde en el agar. El antibiótico se propaga radialmente a través del espesor del agar desde el disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas de 18-24 horas de incubación alrededor de los discos aparecen halos inhibitorios. La concentración de antibiótico en la interfaz entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución (García, *et. al*, 2000).

La técnica de difusión en agar es cualitativa y sus resultados se pueden interpretar únicamente como sensible, intermedio o resistente, y está diseñada específicamente para bacterias de crecimiento rápido como los *Staphylococcus* sp. o los integrantes de la familia *Enterobacteriaceae*.

Cada antibiótico tiene su halo de inhibición específico y éste depende del tamaño de la molécula del antibiótico y su polaridad; por lo tanto, su halo, en el caso de una cepa sensible tendrá un diámetro muy amplio (Herrera, 1999).

5.11.5. Ensayos Biológicos

El estudio de la sensibilidad antibacteriana a los antibióticos es una de las funciones más relevantes para los laboratorios de microbiología clínica, puesto que permite evaluar nuevos compuestos y sus posibles aplicaciones en distintos fármacos (Taroco, *et. al*, 2008). Para ello, existen dos tipos de métodos: cuantitativos y cualitativos. Los métodos cuantitativos son los que permiten determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM). Por su parte,

los métodos cualitativos son aquellos que permiten caracterizar si un microorganismo es resistente o sensible (Taroco, *et. al*, 2008).

5.12. Métodos de Análisis Instrumental

5.12.1. Liofilización

La liofilización o criodesecación es uno de los métodos más utilizados para la preservación de las cepas de rizobio y es considerado como el segundo mejor método de conservación después del almacenamiento en nitrógeno líquido (Freire y Sato, 1999). La liofilización consiste en un mecanismo mediante el cual se seca el agua de un producto congelado mediante la sublimación bajo presión reducida. Este proceso se realiza en tres fases: primero el producto es precongelado para asegurar una estructura inicialmente sólida, después se procede con el primer secado durante el cual se extrae del 90% a 95% de agua y finalmente el producto es sometido a un segundo secado para retirar el agua restante. Los productos liofilizados pueden ser conservados por periodos prolongados de hasta 4 años. (Freire y Sato, 1999, pp.35)

5.12.2. Cuantificación de Proteínas

Sin duda alguna, el concepto más usado en biotecnología es la cuantificación de proteínas. Evaluar la concentración de proteínas es necesario no solo en los laboratorios de investigación, sino también en la industria alimentaria, en la farmacéutica y en la biotecnología.

Existen muchos métodos para la cuantificación de proteínas. El antiguo método de Kjeldahl se basa en la determinación del nitrógeno total de la muestra. Las proteínas

son digeridas en un medio ácido y el nitrógeno total es determinado por titulación. Además del método anteriormente descrito, existen otros métodos muy sencillos y poco específicos, como la absorbancia de las soluciones de proteínas en la región de la radiación de ultravioleta. Los enlaces peptídicos absorben a 205nm a 201nm, mientras que los triptófanos y tirosinas lo hacen a 280 nm (García y Vázquez, 1998). Muchas sustancias no proteicas absorben fuertemente en la región de ultravioleta, produciendo de esta manera grandes interferencias, como lo es el caso de los ácidos nucleicos (García y Vázquez, 1998).

Determinar la concentración de proteínas en una muestra biológica es una técnica de rutina básica cuando se aborda un esquema de purificación de una proteína concreta, cuando se quiere conocer la actividad específica de una preparación enzimática, para el diagnóstico de enfermedades, así como para otros muchos propósitos (Fernández y Galván, 2017).

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos procesos se basan en: la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el UV; para la formación de derivados químicos; o la capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes (Fernández y Galván, 2017).

VI. Metodología

6.1 Enfoque Metodológico

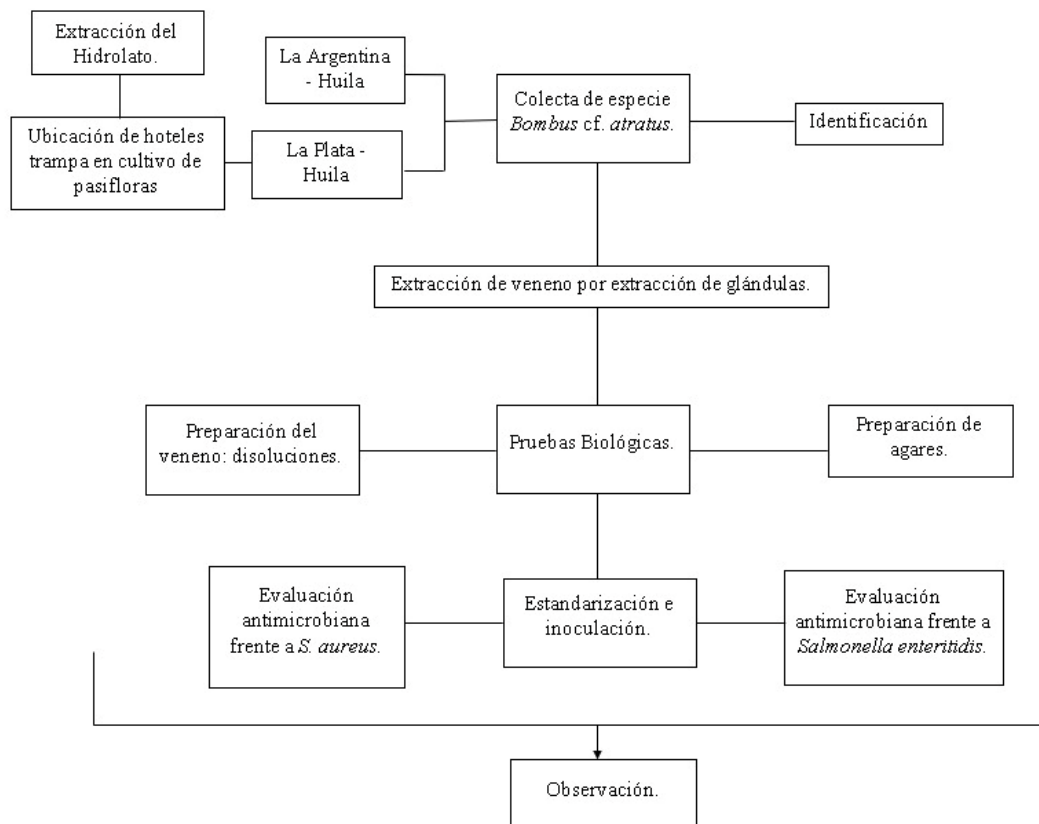
Este estudio conservó un enfoque experimental cuantitativo, tal como se plantea y se observa en la estructura y reporte de resultados en donde se obtuvieron cantidades a partir de ciertas técnicas y mediciones. Según los autores Hernández, *et. al*, (2014, pp.

5), en este tipo de metodología: la recolección de los datos se fundamenta en la medición de las variables o conceptos contenidos en las hipótesis u objetivos. Esta recolección se lleva a cabo al utilizar procedimientos estandarizados y aceptados por una comunidad científica. Para que una investigación sea creíble y aceptada por otros investigadores, debe demostrarse que se siguieron tales procedimientos.

En cuanto a la naturaleza de las variables se tiene en cuenta lo establecido por Martínez (2012): En los estudios con muestreos de datos (elementos) se estudian sus características clasificadas en cualitativas o atributos, expresadas por palabras y se cuantifican mediante el recuento o recuento. Las cuantitativas o variables expresadas en forma numérica, que pueden ser medidas (variable continua) o contadas (variable discreta).

Figura 5.

*Diseño experimental para la obtención de los venenos de *Bombus cf atratus*.*



Nota. Tomado de (autoría propia)

6.2. Construcción y mantenimiento de los hoteles

En primer lugar, se contruyeron dos estructuras en forma de casa de dos niveles de 90 cm de largo y 80 cm de ancho. En la parte superior del hotel se colocó bambú, guadua y madera; mientras que en el espacio inferior se empleó únicamente madera teniendo en cuenta el grosor del *Bombus cf atratus* puesto que debían estar a su medida.

Figura 6.

Posicionamiento de los hoteles.



Nota. Adaptado de (autoria propia)

Uno de los hoteles se ubicó en la finca La Primavera (figura 6) ubicada en la vereda del Roble, en el municipio de La Plata-Huila (N: 02°10'57.24"; W: 76°00'14.23", 1980 msnm).

Figura 7.

Mantenimiento de los hoteles.



Nota. Tomado de (autoria propia)

Por otro lado, el segundo hotel se instaló en la finca Bella Vista (figura 7), posicionada en la vereda del Roble ubicada en el municipio de La Plata-Huila (N:02°13'26.77"; W:75°58'27.74", 2089 msnm). En la *figura 7*, se puede apreciar la fotografía del cultivo.

6.3. Extracción de hidrolato

Con el objetivo de atraer a los abejorros a los respectivos hoteles de cada zona se extrajo el hidrolato de la granadilla (*Passiflora ligularis*) empleando el método de hidrodestilación simple. Por lo tanto, se pesaron 50 g de algunos órganos de la planta como tallos, hojas y semillas, para el secado en un horno Memmert modelo 30-750 durante 3 días a 50 °C (figura 8).

Figura 8.

Secado de material vegetal.



Nota. Tomado de (autoría propia)

Luego, los tallos, las hojas y las semillas se mezclaron con 500 mL de agua destilada, en un balón aforado de 1L. Posteriormente, se armó el montaje, tal como se aprecia en la figura 9, donde la mezcla se destiló por un tiempo aproximado de 6h. Por último, se recolectó el hidrolato en una probeta de 1L para después, transvasarlos a botellas de plástico y así, hacer su envío a la localización de los hoteles con el propósito de efectuar su aplicación.

Figura 9.

Montaje Hidrodestilación simple.



Nota. Tomado de (autoría propia).

6.4. Captura de los Abejorros y su identificación

La captura de los especímenes se realizó en el momento de la polinización de la flor, con ayuda de una mini malla, para luego depositarlos en una red de mayor tamaño con el fin de capturar la mayor cantidad de individuos, como se muestra en la figura 10.

Figura 10.

Colecta de Abejorros.



Nota. Tomado de (autoria propia)

Posteriormente, se llevó a cabo la identificación taxonómica de los abejorros colectados (tres especímenes por cada lugar de colecta) con el estereoscopio (figura 11).

Figura 11.

Identificación de los abejorros con estereoscopio Leica EZ4.



Nota. Tomado de (autoría propia).

6.5 Extracción de Glandulas

Para llevar a cabo el proceso de extracción de cada glándula de veneno, se empleó una placa de vidrio de 30 cm de largo y 20 cm de ancho, previamente esterilizada con alcohol. Cada abejorro fue sujetado con pinzas, con el fin de sustraer el aguijón junto con la glándula con previa estimulación de la parte final del abdomen. Finalmente, con ayuda de una cuchilla, se separó la glándula de dufour de los tubos de Malpighi, y algunos restos intestinales, que fueron puestos en los criotubos, para su posterior refrigeración en el termo con nitrógeno líquido, tal como se muestra en la (figura 12).

Figura 12.

Glándula de veneno con restos intestinales.



Nota. Tomado de (autoría propia).

6.6. Extracción de veneno

Las glándulas se abrieron cuidadosamente para la extracción del veneno sin los restos de quitina, usándose dos agujas de insulina, previamente esterilizada. Finalmente, se guardó el veneno en criotubos limpios para almacenarlos en una nevera a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (figura 13).

Figura 13.

Extracción del veneno con agujas de insulina.



Nota. Tomado de (autoría propia).

6.7. Liofilización de las muestras

Las muestras congeladas se sublimaron al vacío sin producir alteraciones en su estructura básica ni su composición (figura 14). Este proceso atraviesa tres fases: congelamiento, desecación primaria y desecación secundaria. Para la etapa inicial, se introdujo la matriz en el liofilizador para comenzar con el congelamiento a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una presión atmosférica haciendo que la temperatura de las bandejas decaiga velozmente. Inmediatamente, se prosiguió con la desecación primaria, en esta fase se incrementó rápidamente la temperatura de las bandejas disminuyendo la presión hasta ser un poco inferior a 100 mmHg con la ayuda de la bomba de vacío para que, de esta manera, ocurriera la sublimación eliminando la mayor parte de agua del veneno.

Figura 14.

Liofilización del veneno mediante el Freeze Dryer.



Nota. Tomado de (autoría propia).

Finalmente, el ciclo terminó con una última fase llamada desecación secundaria en donde se da una desorción de agua del 30 %. Allí, la humedad residual baja hasta los límites exigidos para garantizar su estabilidad. Como en este punto no existe agua libre, la temperatura de las bandejas puede subir sin riesgo de que se produzca fusión dejando como resultado una humedad menor del 1%, puesto que nunca debe ser cero en vista que hay proteínas y péptidos que exigen un contenido de humedad determinado para conservar sus estructuras secundarias y terciarias y, por tanto, su actividad.

6.8. Ensayos Biológicos

6.8.1. Preparación del Veneno

Se tomó la muestra de veneno seca, proveniente del municipio de La Plata-Huila, y se agregó 1 mL de solución de Ringer, mediante una micropipeta de 1000 μ L y con ayuda de un balín pequeño inoxidable, la mezcla se agitó en un vortex hasta su homogenización (figura 15).

Figura 15.

Disolución del veneno con ayuda del Vortex.



Nota. Tomado de (autoría propia).

Luego, se prepararon diluciones de 0,5 mL a 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 50 ppm y 159 ppm. Este mismo procedimiento se repitió con la muestra del municipio de La Argentina-Huila, pero en esta ocasión, se hicieron solo tres disoluciones a 10 ppm, 20

ppm y 44 ppm, debido a la poca cantidad de veneno colectado de los individuos presentas en esta localidad (figura 16).

Figura 16.

Disoluciones preparadas a diferentes concentraciones.



Nota. Tomado de (autoría propia).

6.8.2. Preparación de los agares

Para el agar soya y tripticaseína (TSA) se mezclaron 10 g del medio de cultivo con 250 mL de agua destilada en un Erlenmeyer. El agar Mueller-Hinton se preparó con 9,75 g en 250 mL de agua destilada y el agar nutritivo se preparó con 1,564 g de en 68 mL de agua destilada. Luego, cada uno de los agares se agitó hasta disolución completa, posteriormente se taparon con papel y se aseguraron con cinta. Posteriormente, las pinzas y los isopos se envolvieron en una hoja de papel para su esterilización (figura 17).

Figura 17.

Preparación de los agares y de los materiales.



Nota. Tomado de (Autoria Propia)

Seguidamente, se le adhirió a cada paquete la cinta indicadora que sirve para diferenciar las unidades esterilizadas, ya que las rayas impresas de color amarillo se transforman en marrón oscuro. Luego, se introdujo cada paquete y los agares en la autoclave durante 1h para el proceso de esterilización por medio del contacto con el vapor de agua bajo presión. La presión suministra al vapor una temperatura más alta que la habitual al nivel del mar que es 100 °C (figura 18).

Figura 18.

Materiales llevados a autoclavar.



Nota. Tomado de (Autoria Propia)

Posteriormente, los agares, las pinzas y los isopos se dejaron reposar durante 2 minutos a temperatura ambiente. El agar TSA, se distribuyó de forma uniforme en 10 cajas de Petri de vidrio y el agar Muller-Hinton se distribuyó en 10 cajas de Petri de plástico, previamente esterilizadas. Por último, el agar nutritivo se depositó en 2 cajas de Petri y dos tubos de ensayo de manera inclinada (figura 19).

Figura 19.

Distribución de los agares en las cajas de Petri.



Nota. Tomado de (Autoría Propia)

6.8.3. Preparación del inóculo

Se seleccionaron de 2 a 3 colonias de cada bacteria: *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus* (figura 20) de un cultivo puro suministrado por el laboratorio de microbiología de la Universidad Surcolombiana. Luego, se replicaron las colonias seleccionadas en los agares nutritivos (cajas de petri y tubos de ensayo con tapa) y en agar sangre. Posteriormente, estas cajas de petri y tubos de ensayo con tapa se llevaron a incubar a una temperatura de 37°C durante 24 horas.

Figura 20.

Replica de las bacterias Salmonella enteritidis y S. aureus.



Nota. Tomado de (Autoria Propia)

6.8.4. Estandarización del Inoculo

El inoculo se estandarizó a la escala de McFarland con una turbidez de 0,5, lo cual corresponde a una concentración viable de microorganismos de 10^6 por cada mililitro.

El estándar se preparó adicionando 0,5 mL de una solución de BaCl_2 a 1.175 % y 99,5 mL de una solución de H_2SO_4 al 1 %. La mezcla se agitó hasta lograr homogeneidad de la solución. Por otra parte, a los tubos de ensayo replicados con las bacterias de *Salmonella enteritidis* y *S. aureus*, se les adicionó 2 mL de solución salina para desprender las bacterias del agar y de esta manera ir comparándolo con el estándar

previamente preparado y así lograr el estándar de 0,5 en la escala de McFarland. Este procedimiento se repitió hasta la adición de 10 mL de solución salina a los tubos de ensayo (figura 21 y 22).

Figura 21.

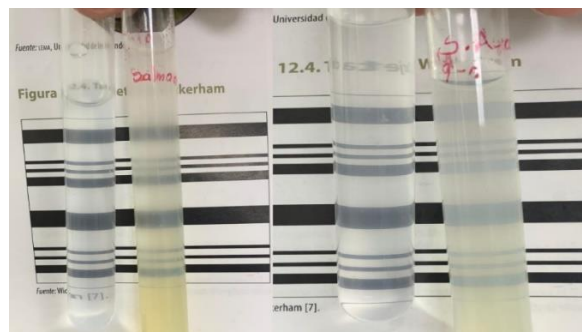
Estandarización de los inoculos para Salmonella enteritidis y Staphylococcus aureus mediante la adición de solución salina a los tubos de ensayo.



Nota. Adaptado de (Autoria propia)

Figura 22.

Estandarización de los inoculos de Salmonella enteritidis y S. aureus según la escala de McFarland.



Nota. Tomado de (Autoria propia)

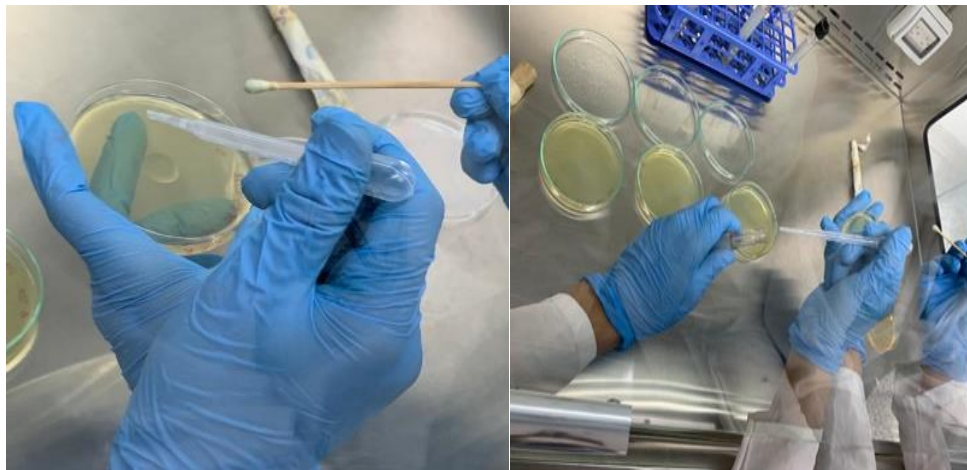
6.8.5 Siembra de las bacterias

Luego, de haber realizado la estandarización correctamente, se procedió a sembrar las bacterias de *Salmonella enteritidis* en las cajas de petri con el agar TSA. Por lo tanto, se midieron 100 μ L del inóculo de la bacteria mediante una micropipeta previamente esterilizada y se sembraron de forma masiva sobre cada una de las cajas de Petri. Este mismo procedimiento se repitió para la siembra de *S. aureus* sobre las cajas de Petri con el agar Muller-Hinton (figura 23).

Después, los sensidiscos se impregnaron con cada una de las concentraciones del veneno del *Bombus* de la siguiente manera: tres sensidiscos con un aproximado de 6 mm fueron depositados en cada caja de Petri a 5, 10, 20, 50, y 159 ppm del veneno proveniente del municipio de la Plata-Huila y tres sensidiscos a 10, 20 y 44 ppm del veneno procedente de La Argentina-Huila. Como control positivo, se empleó una caja de petri con dos sensidiscos impregnados con una solución de Amoxicilina por cada una de las bacterias, y como control negativo se emplearon dos sensidiscos impregnados con una solución salina. Finalmente, las cajas de petri se rotularon y se dejaron reposar durante 5 min para ser llevadas a incubar a una temperatura de 37°C durante 24 horas.

Figura 23.

Siembra de los inoculos de Salmonella enteritidis y S. aureus en los agares de TSA y Muller-Hinton.



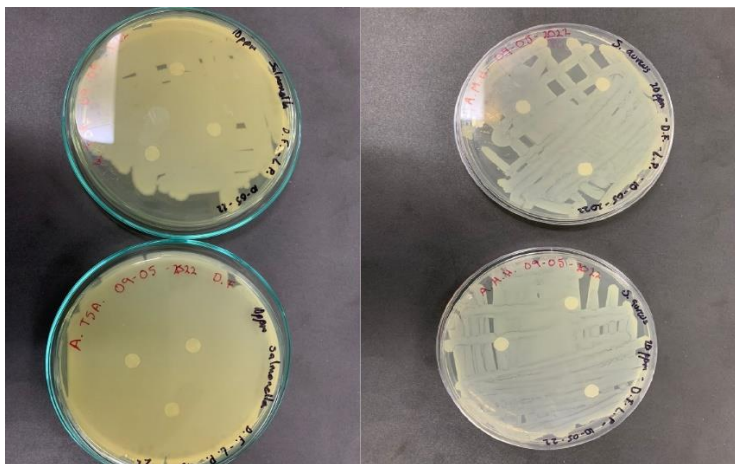
Nota. Tomado de (Autoria propia)

6.8.6. Observación de los resultados

Cumplido el tiempo de incubación de 24 horas, se observó en las cajas, la presencia de halos de inhibición y su comparación con los controles positivos y negativos para la determinación de la susceptibilidad o resistencia microbiana. Para determinar el tamaño de los halos de inhibición se tomaron fotos de los sensi discos junto con un papel milimetrado para tener una medida como referencia y se paso por el software de “image J”, (figura 24).

Figura 24.

Determinación de los resultados de las cajas de Petri con los sensi discos en *Salmonella enteritidis* y *S. aureus*.



Nota. Tomado de (Autoria Propia)

6.9 Cuantificación de Proteínas

Con el fin de realizar la cuantificación de proteínas en las muestras de veneno de *Bombus* se implementó la metodología de Protein A280 con un espectrofotómetro NanoDrop 2000c. Se empleó como blanco una solución de 2.0 μ L de agua destilada la cual fue depositada sobre el lector del espectrofotómetro. Luego, 2.0 μ L del veneno de La Plata, fueron analizados entre los 220 nm a los 350 nm por tres replicas, siguiendo el mismo procedimiento. De igual manera, se llevó a cabo la cuantificación de proteínas del veneno de La Argentina siguiendo la misma metodología, descrita para el veneno de La Plata, (figura 25 y 26).

Figura 25.

Montaje de una muestra depositada sobre el lector de un espectrofotómetro.



Nota. Tomado de (NanoDrop Products, 2010)

Figura 26.

Montaje en el laboratorio con el NanoDrop 2000c para realizar la cuantificación de las muestras de veneno.



Nota. Tomado de (Autoria Propia)

VII. Resultados y Análisis

7.1. Resultados

7.1.1. Determinación taxonómica de la especie de abejorro

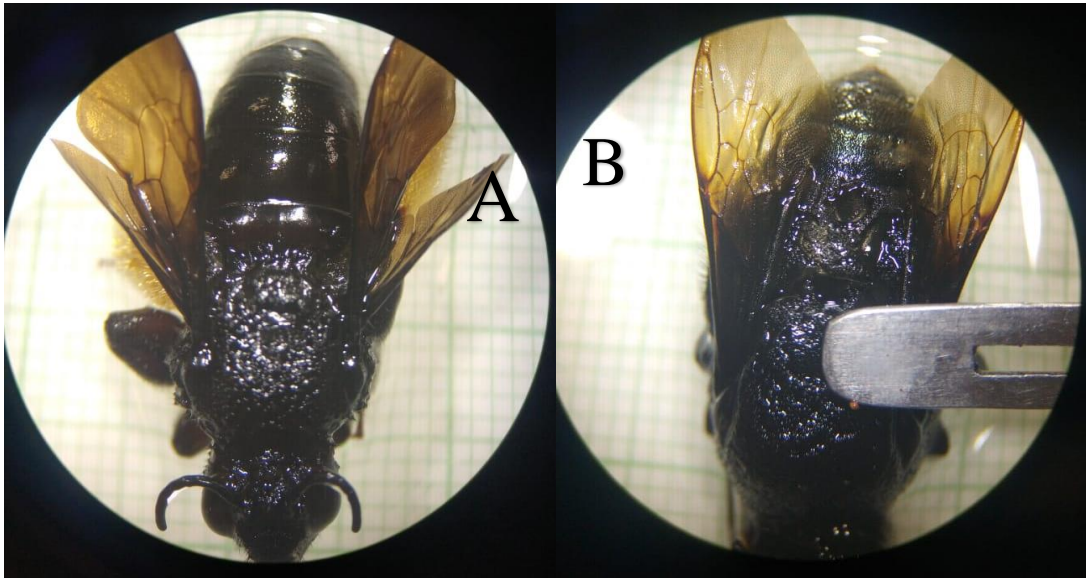
Para la clasificación de los especímenes colectados en dos fincas con presencia de hoteles ubicadas en el municipio de La Plata y una finca sin la presencia de hoteles ubicada en el municipio de La Argentina, se llevaron 3 individuos de cada lugar de colecta al laboratorio de Biología de la Universidad Surcolombiana, conservados en alcohol.

Posteriormente, se realizó la observación detallada de los especímenes en las diferentes regiones del cuerpo, en donde se tomaron fotografías y medidas para compararlas con lo establecido en la literatura (tabla 3, figura 27 y 28).

Antenas	7,113	5,915	Segmento Abdominal 3	3,266	3,469	Tarso 1	5,208	3.710
Cabeza Largo	6,987	5,582	Segmento Abdominal 4	2,134	2,534	Tarso 2	0,746	0.639
Cabeza Ancho	7,262	6,854	Segmento Abdominal 5	1,967	1,089	Tarso 3	0,437	0.565
Aparato Bucal	4,067	3,987	Segmento Abdominal 6	0,627	0,511	Tarso 4	0,488	0.411
Organo Lamedor	8,452	7,876	Segmento Abdominal 7	0,278	0,327	Tarso 5	0,233	0.446
			Abdomen Largo	13,838	13,651	Uña	0,694	0.828
			Abdomen Ancho	7,880	7,103			

Figura 27

Especímenes capturados para realizar su respectiva identificación morfológica y taxonómica. (A) Abejorro proveniente del municipio de La Plata, (B) Abejorro proveniente del municipio de La Argentina.



Nota. Tomado de (Autoria propia)

Figura 28.

Taxonomía de la cabeza de los Bombus cf atratus y diferentes ángulos de la cabeza.



Nota. Tomado de (Autoria propia)

Figura 29.

*Taxonomía de las alas y de las patas del *Bombus cf atratus*.*



Nota. Tomado de (Autoría propia)

Finalmente, la pilosidad que presentaron los abejorros de la Plata fue larga y completamente negra (melánica); en cambio los abejorros provenientes de La Argentina presentaron una pilosidad igualmente larga e irregular de color negro con franjas amarillas (flavínica) como se puede observar en la figura 29 apartado B.

7.1.2. Extracción de las glándulas venenosas del *Bombus cf atratus*.

El veneno de los abejorros se colectó a través de la metodología de extracción de glándulas. Las tablas 4 y 5, muestran los resultados finales de la totalidad de glándulas venenosas conseguidas en los municipios de La Plata y La Argentina, respectivamente.

Tabla 4.

Ejemplares del municipio de La Plata-Huila.

Fecha	Día	Hora	Número de ejemplares capturados	Número de glándulas extraídas
13/12/2021	Lunes	5:30 p. m.	5	5
15/12/2021	Miércoles	5:30 p. m.	4	4
16/12/2021	Jueves	10:30 a. m.	10	10
20/12/2021	Lunes	10:30 a. m.	12	11
21/12/2021	Martes	10:30 a. m.	12	12
22/12/2021	Miércoles	9:30 a. m.	14	11
23/12/2021	Jueves	10:30 a. m.	12	11
26/12/2021	Domingo	9:00 a. m.	23	16
Total			92	80

Figura 30.

Relación de los abejorros capturados del municipio de La Plata-Huila en función de las glándulas extraídas.

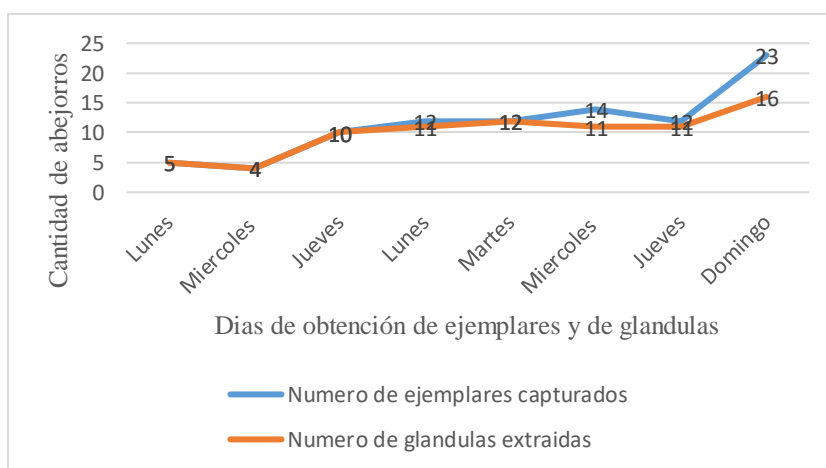


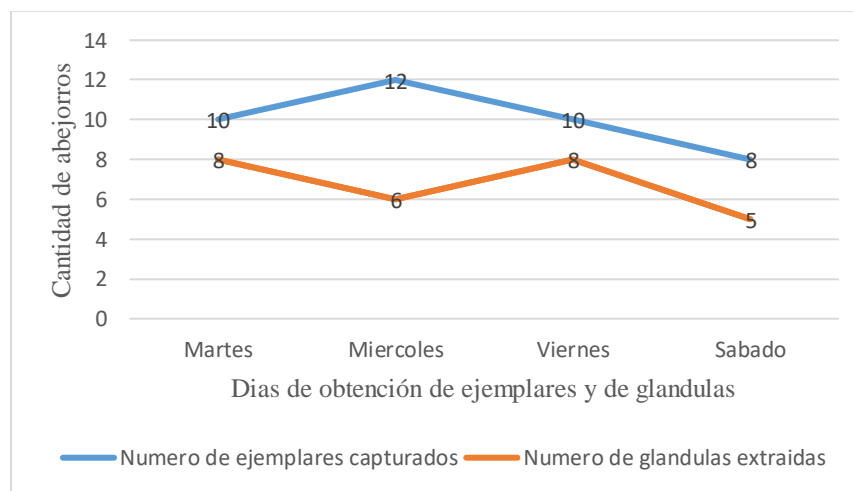
Tabla 5.

Ejemplares del municipio de La Argentina-Huila

Fecha	Día	Hora	Numero de ejemplares capturados	Numero de glandulas extraidas
4/01/2022	Martes	9:30 a. m.	10	8
5/01/2022	Miercoles	10:00 a. m.	12	6
7/01/2022	Viernes	10:30 a. m.	10	8
8/01/2022	Sabado	11:00 a. m.	8	5
Total			40	27

Figura 31.

Relación de los abejorros capturados del municipio de La Argentina-Huila en función de las glándulas extraidas.



Según la tabla 4, se puede apreciar que se hizo la captura de 92 especimenes provenientes del municipio de La Plata-Huila, de los cuales a tan solo 80 de estos, se les extrajo las glándulas venenosas. Lo anteriormente expuesto, se pudo haber presentado a causa de algunos inconvenientes al momento de hacer la extracción de las glándulas. Por

otro lado, como se logra evidenciar en la (figura 30), la relación entre la cantidad de especímenes capturados y la cantidad de glándulas obtenidas se mantuvo muy cercana, presentando la mayor pérdida de materia el día Domingo con 6 especímenes a los cuales no se les logró obtener la glandula venenosa. La tabla 5, reporta la captura de 40 individuos pertenecientes al municipio de La Argentina-Huila, de los cuales a tan solo 28 de estos se les logró obtener las glándulas venenosas (figura 31), esto debido a que en este lugar de estudio también se presentaron algunos problemas al momento de la extracción de las glándulas venenosas.

7.1.4. Recolección y determinación de la cantidad del veneno del *Bombus cf atratus*.

Luego de haber recolectado el veneno contenido en las glándulas venenosas, se determinó la cantidad de volumen mediante el software “image J”. Los resultados se tabularon como se muestra en la tabla 6.

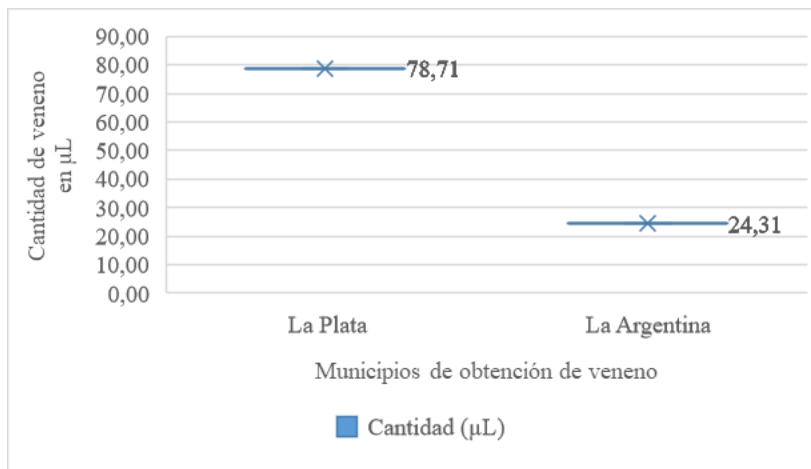
Tabla 6.

*Cantidad total obtenida del veneno de la especie *Bombus cf atratus*.*

Lugar proveniente de la muestra	Diametro de una glandula de veneno (mm)	Radio	Volumen (μL)	Numero de muestras	Cantidad (μL)
La Plata	1,234	0,617	0,984	80	78,71
La Argentina	1,198	0,599	0,900	27	24,31
Total				107	103,01

Figura 32.

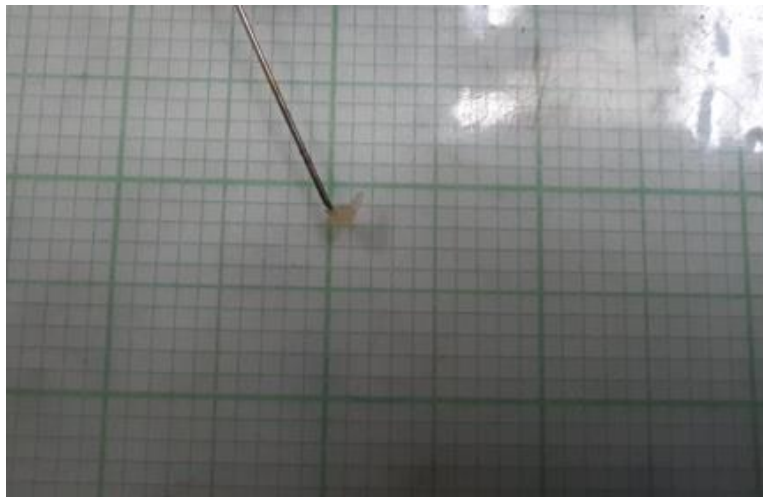
Cantidad del veneno obtenido en relación con el lugar de colecta.



Como se puede apreciar en la tabla 6 y en la figura 32, la cantidad de veneno que se obtuvo en el municipio de La Plata fue de 78,72 µL, el cual fue mayor al obtenido del municipio de La Argentina que fue de 24,31µL. Estos resultados se encuentran relacionados con el número de glándulas extraídas de los especímenes, el cual fue mayor en el municipio de la Plata (80) que en el de la Argentina (27). El veneno, (figura 32), obtenido se depositó en criotubos y se llevó a refrigeración en un congelador para la conservación de las muestras a -80 °C.

Figura 33.

Veneno obtenido de la glandula de los abejorros.



Nota. Tomado de (Autoria propia)

7.1.5. Liofilización del veneno del *Bombus cf atratus*.

Los resultados del proceso de Liofilización indicaron la cantidad catalítica de agua presente en las muestras de veneno del *Bombus*, ya que la curva de temperatura mostrada en el liofilizador se mantuvo de manera constante durante todo el proceso a 32 °C, esto debido a que, en primera instancia las muestras se dejaron reposar hasta estar a una temperatura ambiente y luego, se llevó las muestras al liofilizador para realizar el respectivo proceso. A pesar de que la temperatura de las bandejas si disminuyó, la temperatura de la muestra se mantuvo constante (figura 34). De acuerdo con esto, se puede decir que, la curva no llegaría al punto triple donde coexisten las tres fases en equilibrio (figura 34).

Figura 34.

Curvas de temperatura de las muestras de veneno en relación a la temperatura de las bandejas.



Nota. Tomado de (Autoria propia)

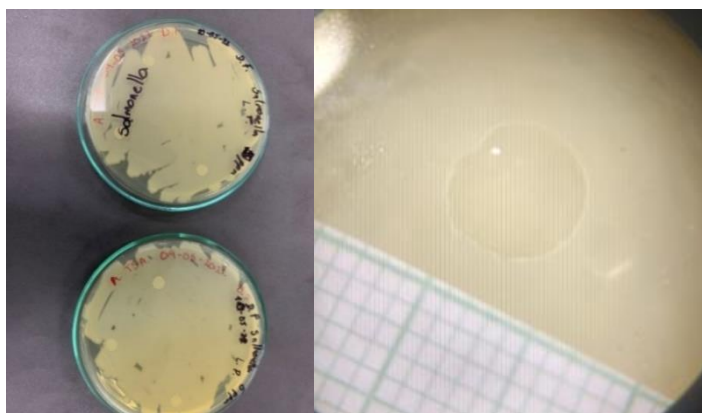
7.1.6. Pruebas Biológicas

Los resultados obtenidos de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, para determinar el potencial de los venenos del *Bombus* contra las cepas de *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus*, se muestran a continuación:

7.1.6.1 Pruebas Biologicas contra *Salmonella enteritidis*.

Figura 35.

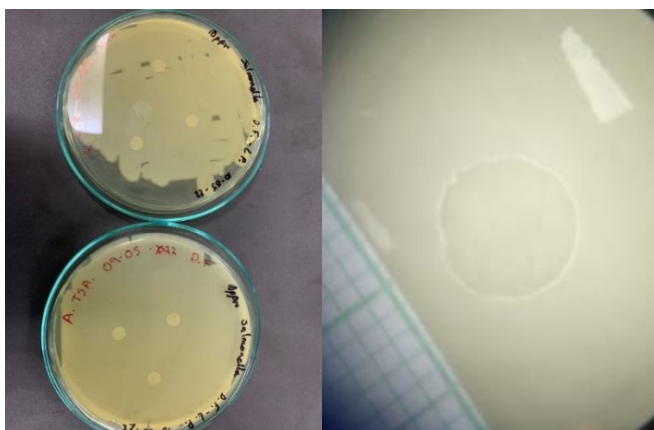
Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Salmonella enteritidis con el veneno del Bombus cf atratus del municipio de La Plata a concentraciones de 5 ppm.



Nota. Tomado de (Autoria propia)

Figura 36.

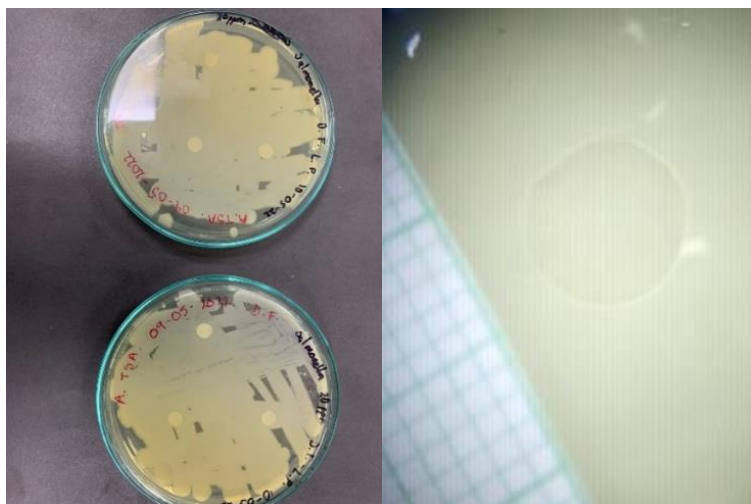
Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Salmonella enteritidis con el veneno del Bombus cf atratus del municipio de La Plata a concentraciones de 10 ppm.



Nota. Tomado de (Autoria propia)

Figura 37.

Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Salmonella enteritidis con el veneno del Bombus cf atratus del municipio de La Plata a concentraciones de 20 ppm.



Nota. Tomado de (Autoria propia)

Los halos obtenidos para el veneno de la Plata-Huila contra *Salmonella enteritidis* a concentraciones de 5, 10, 20, 50 y 159 ppm (figura 35, 36, 37 y 42) se analizaron por el programa de “Image J” en donde no se halló presencia de inhibición según las medidas mostradas en la tabla 7.

Tabla 7.

Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Salmonella enteritidis con el veneno del Bombus cf atratus del municipio de La Plata.

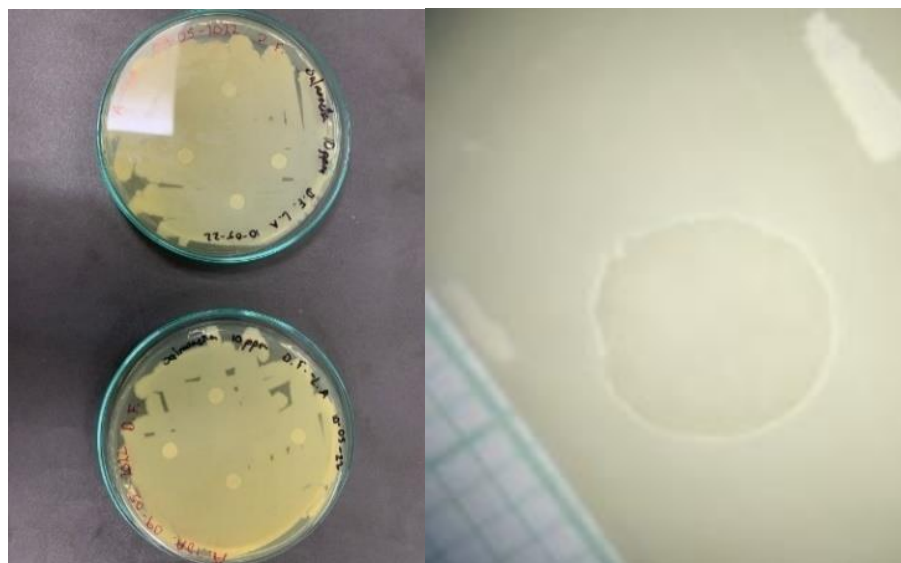
Tratamiento	Halos de inhibición (mm)			Promedio	Varianza	Desviación estandar
	Replica 1	Replica 2	Replica 3			
5 ppm	6,65	6,71	6,85	6,74	0,01	0,10
10 ppm	6,86	6,87	6,86	6,87	1,43E-05	0,003

20 ppm	7,02	6,99	7,00	7,00	0,0002	0,01
50 ppm	6,13	6,00	6,10	6,08	0,004	0,06
159 ppm	6,17	6,39	6,28	6,28	0,01	0,11
Azitromicina	9,40	8,99	9,52	9,31	0,07	0,27
Solución Salina	0	0	0	0	0	0

Como se logra apreciar en la tabla 7, los halos mostrados del veneno proveniente del municipio de La Plata-Huila en contra de *Salmonella enteritidis*, evidenciaron medidas, pero no se considera significativas para determinarlos como inhibición de la bacteria.

Figura 38.

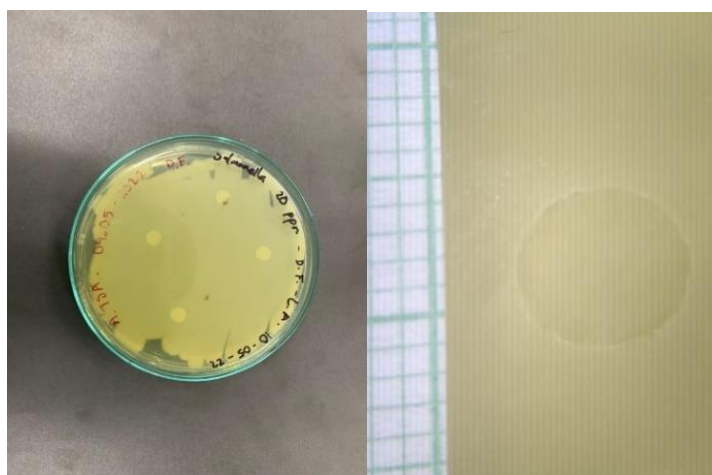
Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Salmonella enteritidis con el veneno del Bombus cf atratus del municipio de La Argentina a concentraciones de 10 ppm.



Nota. Tomado de (Autoria propia)

Figura 39.

Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Salmonella enteritidis con el veneno del Bombus cf atratus del municipio de La Argentina a concentraciones de 20 ppm.



Nota. Tomado de (Autoria propia)

Tabla 8.

Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Salmonella enteritidis con el veneno del Bombus cf atratus del municipio de La Argentina.

Tratamiento	Halos de inhibición (mm)				Varianza	Desviación estandar
	replica 1	replica 2	replica 3	Promedio		
10 ppm	6,25	6,33	6,32	6,30	0,002	0,04
20 ppm	6,86	6,87	6,86	6,87	1,43E-05	0,003
44 ppm	6,11	6,04	6,16	6,10	0,003	0,06
Azitromicina	9,40	8,99	9,52	9,31	0,07	0,27
Solución Salina	0	0	0	0	0	0

Teniendo en cuenta los resultados presentados en la tabla 8 y en las (figuras 38, 39 y 42), acerca de los halos mostrados con el veneno de La Argentina-Huila frente a la bacteria *Salmonella enteritidis*, tampoco muestran inhibición de la sustancia frente a la bacteria.

En vista de los datos obtenidos, se puede afirmar que las concentraciones de los venenos empleadas en esta investigación no son lo suficientemente altas como para inhibir el crecimiento del 50 % del número de bacterias de *Salmonella enteritidis*, esto debido a que, según lo establecido por (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2022), nos indica que, los halos de inhibición para el caso de la *Salmonella enteritidis* frente al antibiotico Azitromicina empieza a ser suceptible cuando el halo de inhibición es mayor a los 12 mm y presenta resistencia cuando el diámetro del halo de inhibición es menor a los 10mm.

Figura 40.

Relación de las concentraciones de las muestras del veneno de La Plata-Huila, los controles positivos y negativos, contra el tamaño de los halos de inhición.

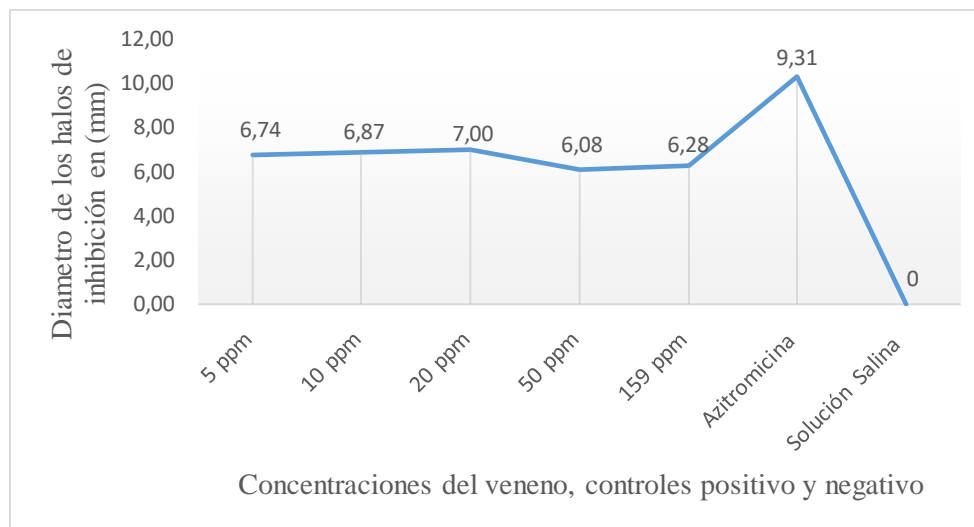
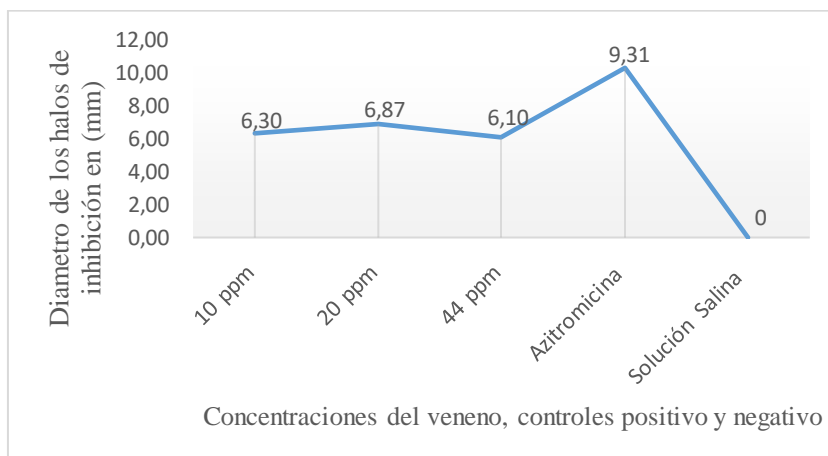


Figura 41.

Relación de las concentraciones de las muestras del veneno de La Argentina-Huila, los controles positivos y negativos, contra el tamaño de los halos de inhibición.

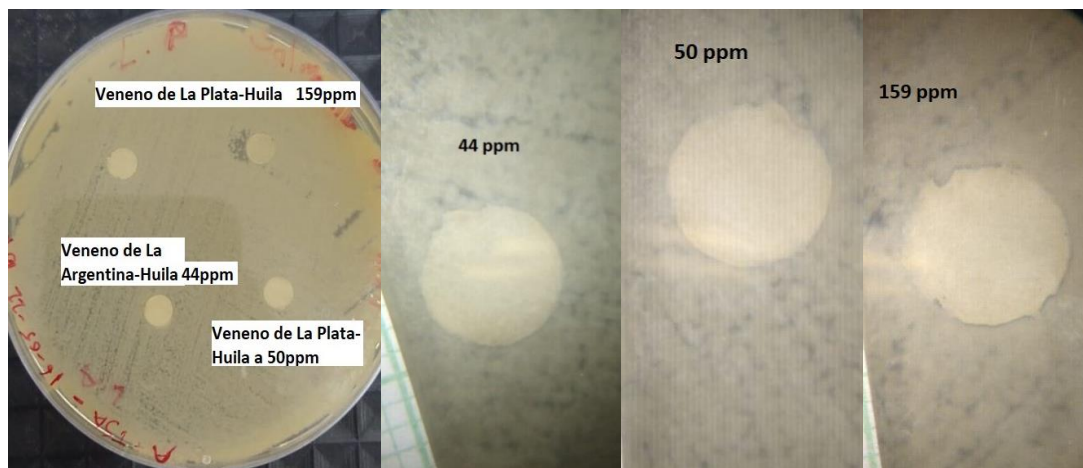


En la figura 40 se puede observar el diámetro de los halos presentados contra la bacteria *Salmonella enteritidis* con relación a la concentración del veneno del *Bombus cf atratus* provenientes del municipio de La Plata, se aprecia que el pico más alto es en la concentración de 20 ppm el cual decrece a 50 y 159 ppm, siendo estas las

concentraciones más altas, lo que indica que la bacteria presentó una adaptación y resistencia a esas concentraciones. Además, se observa que, aunque el pico y el diámetro del halo de inhibición con la Azitromicina son más grandes, (figura 40 y 41), este fue menor a lo que se presenta en la literatura, que es mayor a los 12 mm. Algo muy similar ocurrió con el veneno de La Argentina, (figura 41) donde el pico más alto con la concentración de veneno también ocurrió en 20 ppm y el diámetro del halo inhibitorio con el antibiótico fue menor.

Figura 42.

Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Salmonella enteritidis con la muestra del municipio de La Plata y La Argentina a concentraciones de 44, 50 y 159 ppm.



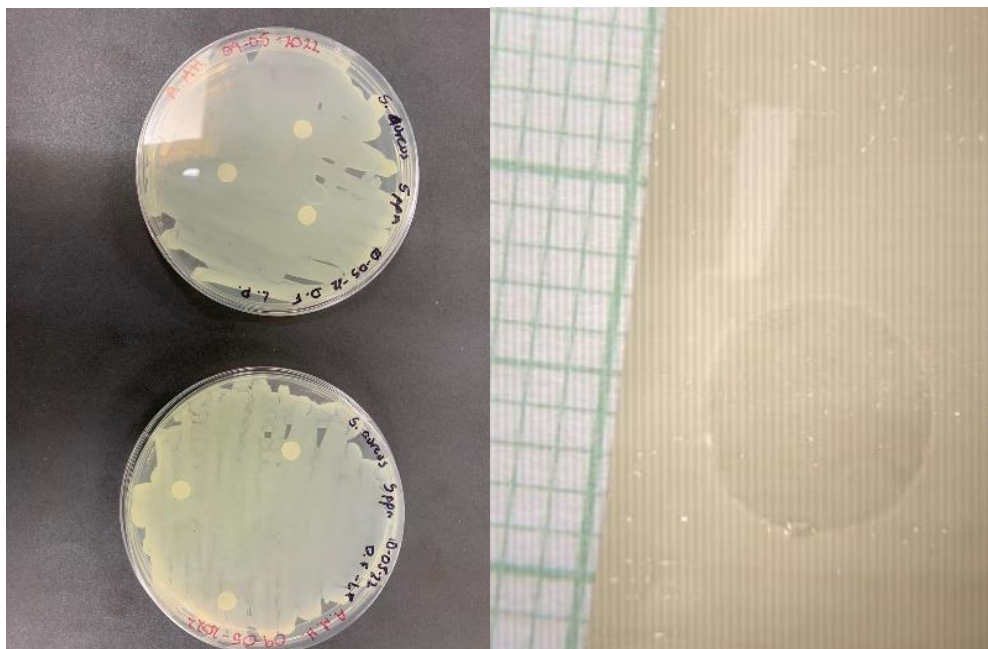
Nota. Tomado de (Autoria propia)

En la figura 42 se muestra la diferencia de halos inhibitorios, siendo el veneno del municipio de La Plata más efectivo contra *Salmonella enteritidis* a una concentración de 159 ppm.

7.1.6.2 Pruebas Biológicas contra *Staphylococcus aureus*

Figura 43.

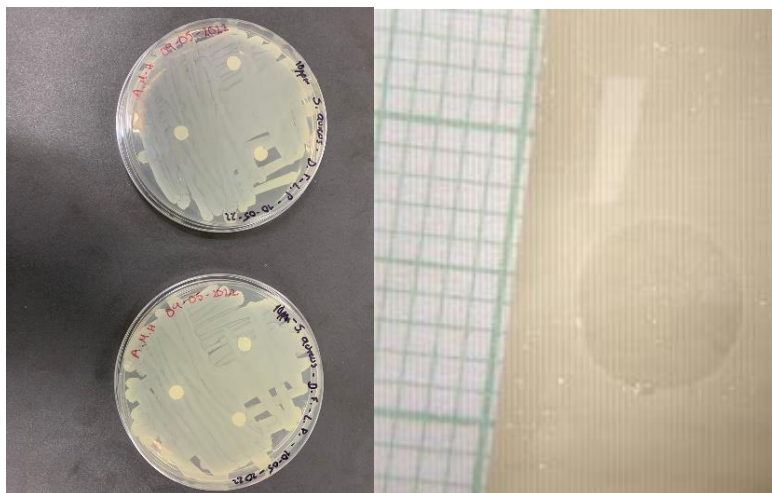
Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Staphylococcus aureus con el veneno del Bombus cf atratus del municipio de La Plata a concentraciones de 5 ppm.



Nota. Tomado de (Autoria propia)

Figura 44.

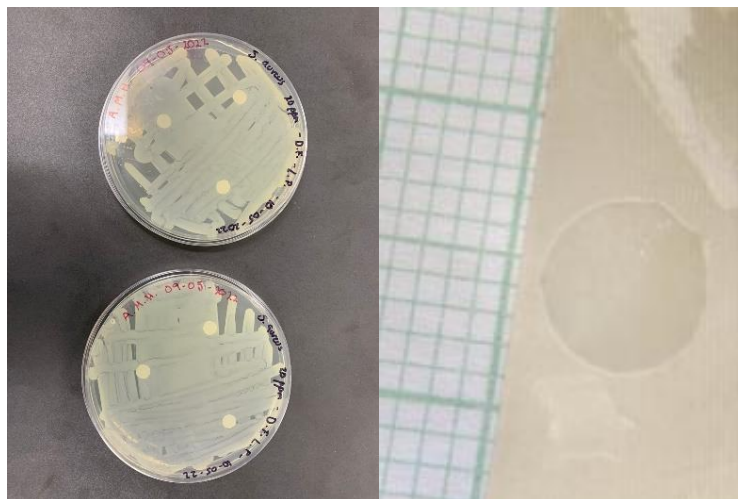
Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Staphylococcus aureus con el veneno del Bombus cf atratus del municipio de La Plata a concentraciones de 10 ppm.



Nota. Tomado de (Autoria propia)

Figura 45.

Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Staphylococcus aureus con el veneno del Bombus cf atratus del municipio de La Plata a concentraciones de 20 ppm.



Nota. Tomado de (Autoria propia)

Tabla 9.

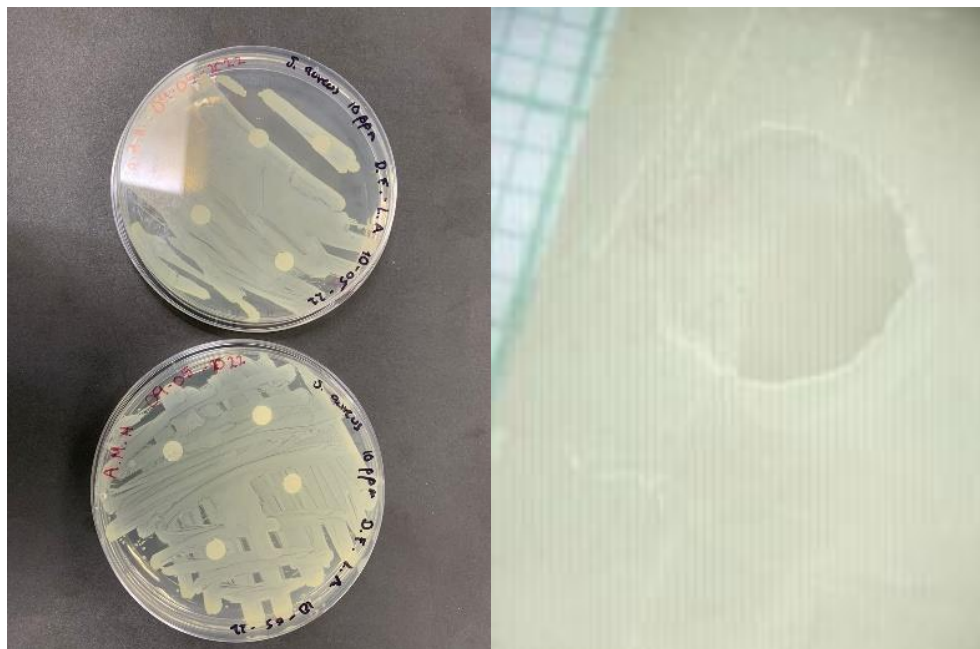
Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Staphylococcus aureus con el veneno del Bombus cf atratus-del municipio de La Plata.

Tratamiento	Halos de inhibición (mm)			Promedio	Varianza	Desviación estandar
	replica 1	replica 2	replica 3			
5 ppm	6,28	6,26	6,31	6,28	0,0006	0,02
10 ppm	6,52	6,39	6,58	6,49	0,009	0,09
20 ppm	6,59	6,63	6,50	6,57	0,004	0,06
50 ppm	8,85	8,98	9,04	8,95	0,008	0,09
159 ppm	9,30	9,98	9,78	9,68	0,12	0,35
Amoxicilina	19,95	19,85	20,80	20,20	0,27	0,52
Solución Salina	0	0	0	0	0	0

En la tabla 9 se muestran los resultados de los halos con el veneno proveniente del municipio de La Plata-Huila frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* (figuras 43, 44, 45 y 48). En consecuencia, se logró estimar las medidas que van desde 6,28 mm ($\pm 0,02$) a 5 ppm hasta 9,68 mm ($\pm 0,35$) para 159 ppm.

Figura 46.

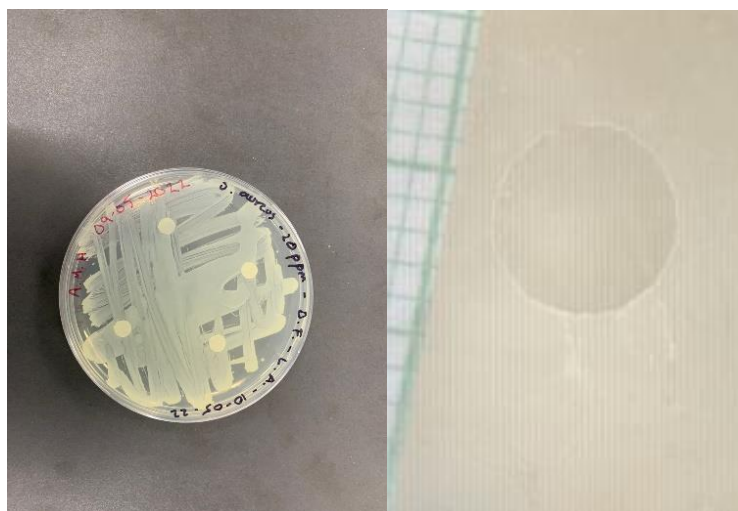
Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Staphylococcus aureus con la muestra del municipio de La Argentina a concentraciones de 10 ppm.



Nota. Tomado de (Autoria propia)

Figura 47.

Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Staphylococcus aureus con la muestra del municipio de La Argentina a concentraciones de 20 ppm.



Nota. Tomado de (Autoria propia)

Tabla 10.

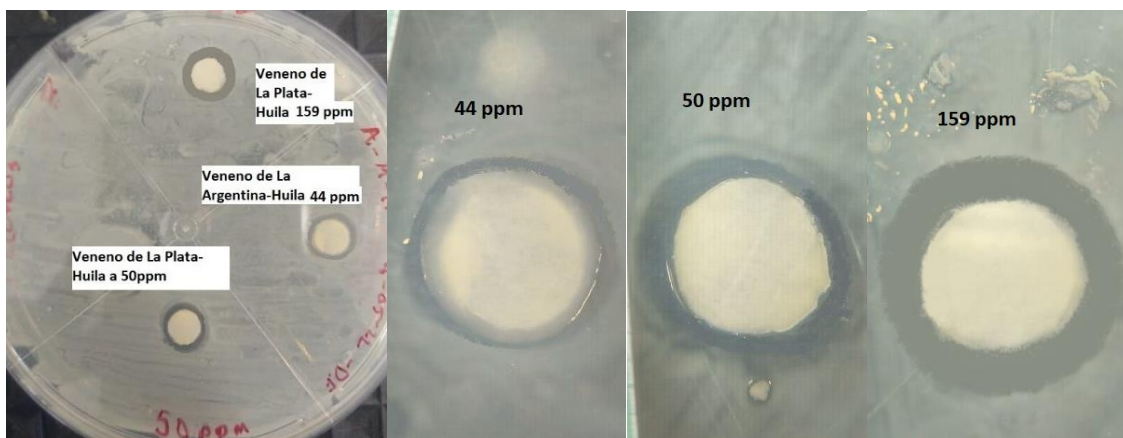
Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Staphylococcus aureus con la muestra del municipio de La Argentina.

Tratamiento	Halos de inhibición (mm)			Promedio	Varianza	Desviación estandar
	replica 1	replica 2	replica 3			
10 ppm	6,18	6,31	6,25	6,25	0,004	0,06
20 ppm	6,30	6,45	6,41	6,38	0,005	0,07
44 ppm	8,33	7,76	8,39	8,16	0,12	0,34
Amoxicilina	19,95	19,85	20,80	20,20	0,27	0,52
Solución Salina	0	0	0	0	0	0

Por otra parte, los resultados expuestos en la tabla 10, relacionados con los halos del veneno proveniente del municipio de La Argentina-Huila, frente a la bacteria *Staphylococcus aureus*, muestran medidas desde 6,25 mm ($\pm 0,06$) para la concentración de 10 ppm hasta 8,16 mm ($\pm 0,34$) para 44 ppm. Estos datos indican la clara relación lineal que hay entre la concentración del veneno con el tamaño de los halos de inhibición para *Staphylococcus aureus* en las concentraciones de 44 ppm, 50 ppm y 159 ppm (figura 46, 47, 48). Adicionalmente, se puede afirmar que los halos de inhibición obtenidos con la Amoxicilina como el control positivo fueron más grandes que los halos de inhibición determinados por las concentraciones de los venenos de la especie *Bombus cf atratus*, demostrando la gran susceptibilidad de esta bacteria frente al farmaco.

Figura 48.

Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para Staphylococcus aureus con la muestra del municipio de La Plata y La Argentina a concentraciones de 44, 50 y 159 ppm.

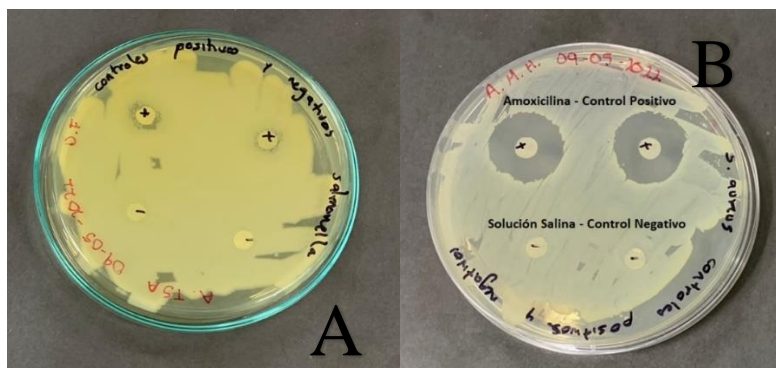


Nota. Tomado de (Autoria propia)

En el ultimo ensayo realizado con tres concentraciones (figura 48): 44 ppm con el veneno del municipio de La Argentina y a 50 ppm y 159 ppm con el veneno del municipio de La Plata, se evidencia los halos de inhibición mencionados anteriormente quedando en claro, la efectividad presentada por el veneneno de La Plata con una mayor área inhibitoria a la más alta concentración empleada.

Figura 49.

Resultados de la prueba de sensibilidad antibacterial para a) Salmonella enteritidis con el control positivo (Azitromicina) y b) Staphylococcus aureus con el control positivo (Amoxicilina) y control negativo (Solución de Ringer).



Nota. Tomado de (Autoria propia)

En la figura 49, se aprecian los halos inhibitorios para los controles positivos con Amoxicilina para *Staphylococcus aureus* y controles negativos con Solución salina, y para la *Salmonella enteritidis* con el control positivo Azitromicina y control negativo Solución salina. Para el caso de *S. aureus* se presentaron halos de inhibición mas grandes en comparación con los halos para *Salmonella enteritidis*.

Figura 50.

Relación de las concentraciones de las muestras del veneno de La Plata-Huila, los controles positivos y negativos, contra el tamaño de los halos de inhición.

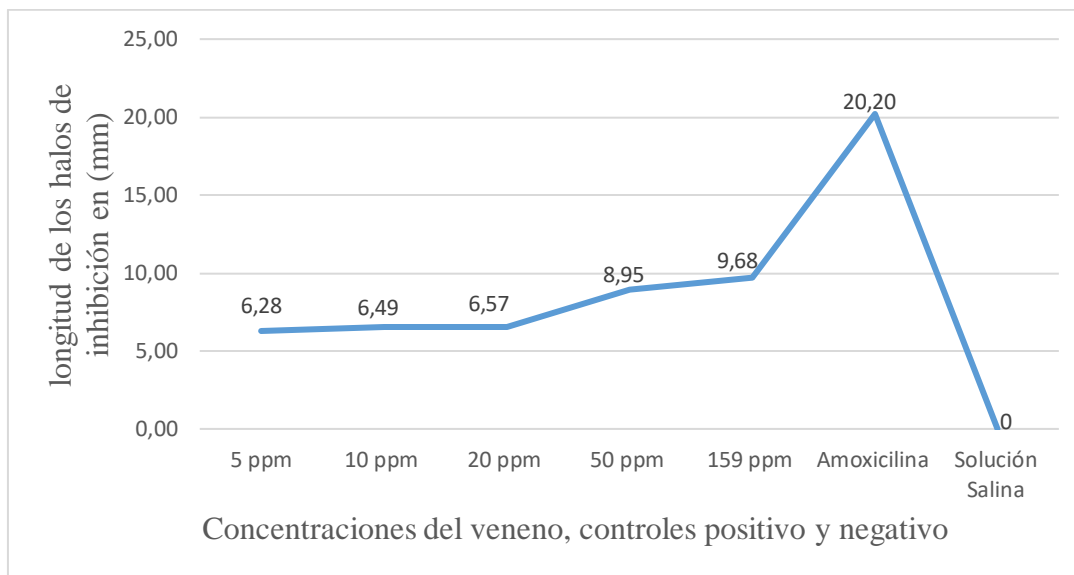
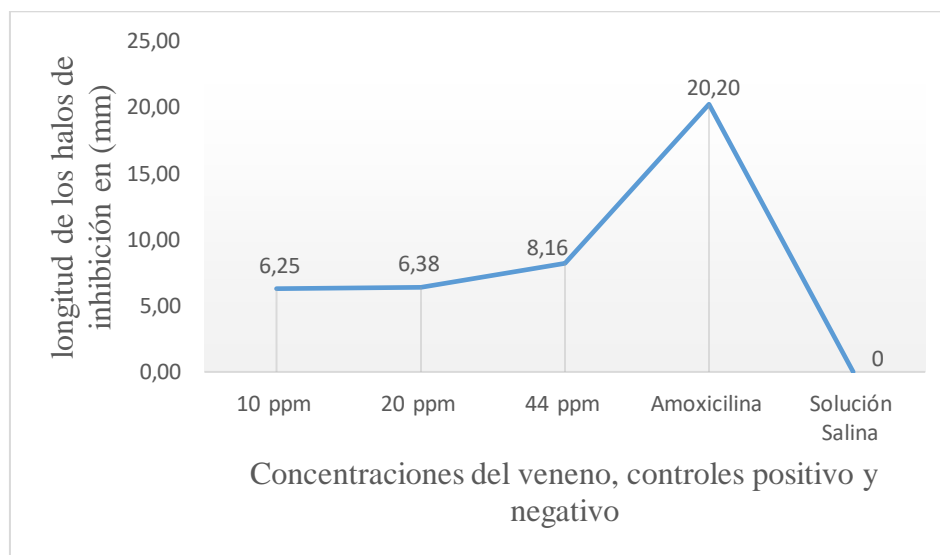


Figura 51.

Relación de las concentraciones de las muestras del veneno de La Plata-Huila, los controles positivos y negativos, contra el tamaño de los halos de inhibición.



En el caso de la bacteria *Staphylococcus aureus*, se alcanzaron mejores resultados con el veneno de La Plata como se logra apreciar en la figura 50, pero en este caso el pico más alto de inhibición se presentó a 159 ppm. De igual manera, con el

veneno de La Argentina se apreció que el pico más alto de inhibición se presentó a 44 ppm como se nota en la figura 51, en contraste con los datos obtenidos con los ensayos en *Salmonella enteritidis* donde el control positivo fue mucho más efectivo con este microorganismo puesto que su pico y el diámetro de los halos de inhibición abarcaron una mayor área alcanzando los 20,20 mm. Esto sugiere que la bacteria *Staphylococcus aureus* se considera intermedia al veneno de los abejorros debido a los halos de inhibición presentados, por otro lado, el *S. aureus* se considera como susceptible ante el antibiotico utilizado como control positivo, puesto que, según lo expuesto por (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2022), indica que los halos de inhibición para el caso de la *Staphylococcus aureus* frente al antibiotico amoxicilina empieza a ser suceptible cuando el halo de inhibición es mayor a los 20 mm y presenta resistencia cuando el diámetro del halo de inhibición es menor a los 19 mm.

7.1.7 Cuantificación de las proteínas presentes en el veneno de La Plata-Huila y de La Argentina-Huila

Tabla 11.

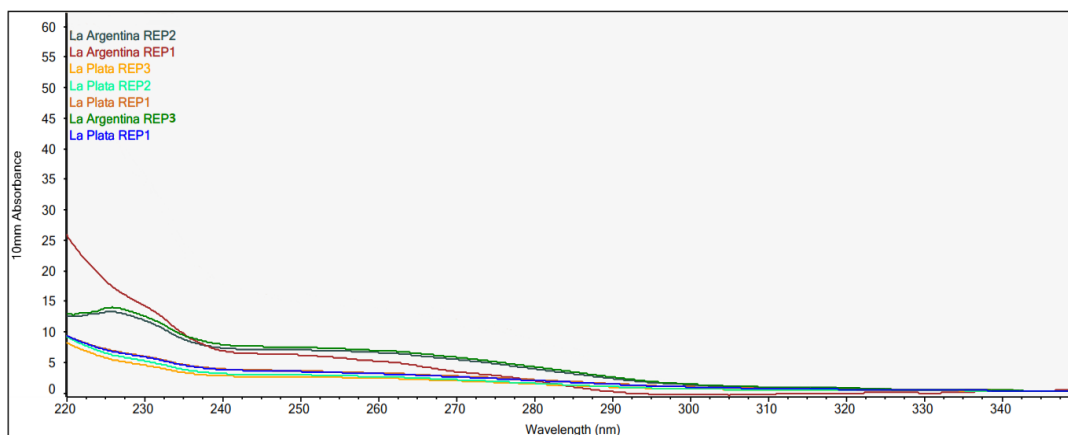
Datos obtenidos para la cuantificación de las proteínas presentes en los venenos de La Plata y La Argentina.

#	Sample ID	Date and Time	Protein	Unit	A280 (Abs)	260/280	Sample Type
1	La Plata REP1	08/06/2022 02:50:49 p.m.	1673	µg/ml	1,673	1,66	1 Abs = 1 mg / mL
2	La Argentina REP3	08/06/2022 02:57:51 p.m.	3916	µg/ml	3,916	1,68	1 Abs = 1 mg / mL

3	La Plata REP1	08/06/2022 02:51:32 p.m.	1777	$\mu\text{g/ml}$	1,777	1,62	1 Abs = 1 mg / mL
4	La Plata REP2	08/06/2022 02:52:21 p.m.	1199	$\mu\text{g/ml}$	1,199	1,90	1 Abs = 1 mg / mL
5	La Plata REP3	08/06/2022 02:53:34 p.m.	1080	$\mu\text{g/ml}$	1,080	1,89	1 Abs = 1 mg / mL
6	La Argentina REP1	08/06/2022 02:54:54 p.m.	1624	$\mu\text{g/ml}$	1,624	2,98	1 Abs = 1 mg / mL
7	La Argentina REP2	08/06/2022 02:55:55 p.m.	3582	$\mu\text{g/ml}$	3,582	1,75	1 Abs = 1 mg / mL

Figura 52.

Cantidad de proteínas presentes en los venenos de los municipios de La Plata y de La Argentina.



Como se logra apreciar en la tabla 11, los datos obtenidos por espectrofotometría permitieron cuantificar las proteínas presentes en las dos muestras de veneno provenientes de los municipios de La Plata-Huila y La Argentina-Huila. Por lo tanto, las replicas mostraron la presencia de proteínas en cada una de las muestras, a una

concentración aproximada de 1432 $\mu\text{g/mL}$ en el veneno de La Plata a una absorbancia entre los 220 nm a los 280 nm, por el contrario, la cantidad de proteínas en el veneno de La Argentina mostraron un promedio aproximado de 3040 $\mu\text{g/mL}$ presentando el mismo rango de absorbancia de 220 nm a 280 nm para cada una de las tres replicas realizadas. La (figura 52), permite apreciar las curvas de cuantificación de proteínas en las muestras colectadas en los dos municipios, con una diferencia notable ya que el veneno del municipio de La Plata logró alcanzar tan solo los 10 nm de absorbancia, sin embargo, el veneno de La Argentina alcanzo el rango de los 13 nm a los 25 nm de absorbancia. Esto indica en primera instancia que hay mucha más cantidad de proteínas presentes en el veneno proveniente del municipio de La Argentina que en el de La Plata, y como segunda medida, que, aunque se determinaron como individuos pertenecientes a la misma especie, la cantidad y posible composición de proteínas presentes en cada uno de los venenos puede variar dependiendo del lugar de captura.

7.2. Discusión

En primer lugar, Aguilar (2016), obtuvo en su investigación con abejas una aceptación media en los hoteles trampa, siendo relativamente baja para el bambú y para la madera una aceptación favorable. Además, este autor también implementó materiales como ladrillos y piñas, pero estos no registraron ocupación por ningún polinizador durante el periodo de estudio en vista de que, sus orificios son cuadrados y demasiados grandes que lo requerido por las abejas.

De acuerdo con lo anterior, en relación a esta investigación se puede apreciar que con los materiales empleados para la construcción de los hoteles trampa, se tuvo un gran

acuerdo con la madera y no tanto con las cañas de bambú, tal como resultó en el estudio previamente mencionado. Esto se debió a que la madera tenía los agujeros de un tamaño adecuado para los abejorros, pero en el caso del bambú, al pasar los días se secó y el espacio en su interior era más pequeño. Sumado a esto, se pudo evidenciar que en los sitios donde se ubicaban estas estructuras, hubo una mayor presencia de abejorros, lo que conllevó a una mayor recolección de glándulas. Sin embargo, se ha inferido que se necesita ubicar a la reina en estas estructuras para que formen su nido, ya que los abejorros utilizaban los hoteles principalmente como refugio frente a las lluvias, pero al pasar de las horas, regresaban a sus hogares originales.

Por otra parte, Correa y Giraldo (2019), afirman que:

La idea de buscar estrategias para proteger a los polinizadores permite garantizar la reproducción y conservación de estos insectos. Sumado a esto, se debe fomentar la importancia de los abejorros con el fin que los campesinos sigan albergándolos y brindándoles un hotel donde vivir y un espacio donde reproducirse.

La identificación de la especie como *Bombus* cf. *atratus* fue posible debido a la similitud entre las partes de los especímenes estudiados y con lo reportado en la literatura científica para este tipo de organismos, ya que según Abrahamovich y Díaz (2007):

Para identificar la especie *Bombus atratus* en Argentina para las castas de las obreras, su cabeza tiene unas medidas de 4,15mm de largo y 3,93 mm de ancho, continuamente el mesosoma mide 4,7 mm de largo y el ancho del metasoma mide 6 mm. Por último, las medidas del ala anterior a lo largo fueron de 11,68

mm y de ancho 4,35 mm. Por otro lado, la pilosidad presente en los abejorros obreras menciona que son más larga e irregularmente distribuida; su coloración es enteramente negra (forma melánica) o combinada con pilosidad amarilla, amarillenta o dorada (forma flavínica).

Según lo descrito, las medidas obtenidas de los ejemplares revisados de los dos municipios permitieron la identificación de los individuos pertenecientes al género *Bombus*, debido a su tamaño que variaba entre los 1cm a los 3,5 cm, además de contar con una abundante pilosidad tal como se encuentra descrito por Pinilla, Ospina, y Cure (2016), “El género *Bombus* está compuesto por abejas eusociales grandes de 1,5 cm – 3,5 cm, robustas y con abundante pilosidad”.

En cuanto a la obtención de glándulas de veneno en esta investigación, se logró evidenciar que los abejorros del municipio de La Plata permitieron un mayor número de estas estructuras (86,9 %) en comparación con aquellas capturadas en el municipio de La Argentina (67,5 %). Esta diferencia fue el resultado de varios inconvenientes encontrados al momento de hacer la extracción de las glándulas; en primer lugar, algunos de los abejorros capturados al momento de estimularlos en la parte final del abdomen, no mostraban su aguijón, por lo que se realizó una incisión en el abdomen para confirmar la ausencia de aguijón, por lo que se infirió que eran individuos machos, esto debido a que en el género *Bombus* al igual que en el género *Apis*, los machos reciben el nombre de Zánganos quienes nacen de huevos sin fecundar, estos no poseen un aguijón porque nunca se ven en la necesidad de defenderse de amenazas puesto que

su misión es exclusivamente inseminar a la reina, y al cumplirla, no son requeridos, entonces son expulsados del nido hasta que mueren de frío (Valenzuela, 2013).

En segundo lugar, hubo existencia de individuos con el aguijón muy corto, lo que dificultó la extracción de la glándula venenosa, por tal motivo, se empleó otra técnica en donde se realizó un corte en el abdomen del espécimen y se trató de retirar la glándula de todos los restos intestinales y las partes quitinosas, pero al momento de extraer la glándula venenosa del cuerpo, esta fue demasiado pequeña y luego de la limpieza de residuos intestinales se determinó como pérdida del material.

Barkan, *et. al*, (2017) obtuvieron entre 2 a 5 μL de veneno implementado la misma técnica de extracción de glándulas por cada individuo, indicando que tanto el lugar de muestreo como también el tipo de especie influye en la cantidad de veneno obtenido. Comparando estos resultados con los obtenidos en esta investigación, el veneno total conseguido de las glándulas de los abejorros colectados fue bajo, en vista que, en el municipio de La Plata se obtuvo un volumen de 0,984 μL por individuo para un total de 78,71 μL y solo se alcanzó un volumen de 0,900 μL por individuo para un total de 24,31 μL para aquellos que fueron colectados en el municipio de la Argentina. Esta diferencia de microlitros se debe a la cantidad de abejorros capturados en cada lugar de estudio.

Según lo que menciona Choo, *et. al*, (2010), en su investigación comprueban que:

la actividad antimicrobiana del veneno del abejorro se debe a la presencia de péptidos antimicrobianos (AMP) y dentro de estos péptidos el que mayor

presencia tiene dentro del veneno es la bombolitina, la cual tienen las mismas propiedades biológicas que la melitina en las abejas melíferas. La melitina posee una actividad antimicrobiana por lo que se plantea que la actividad antibacteriana de la Bi-bombolitina se debe a la formación de poros de membrana. Se descubrió en dicho estudio que la Bi-bombolitina presenta una actividad antibacteriana tanto contra las bacterias gram positivas como contra las Gram negativas.

De acuerdo con esto, es probable que la Bi-bombolitina del *Bombus cf atratus* sea más activa contra las bacterias gram positivas que contra las bacterias Gram negativas, lo que también sugiere que el veneno del *Bombus cf atratus* es un potencial agente antimicrobiano.

Adicionalmente, los AMP son elementos claves de la inmunidad innata contra las bacterias y los hongos tanto en el reino animal, como en el reino vegetal. Dentro de estos péptidos, se tiene a las Cecropinas, los AMP ricos en cisteína, los AMP ricos en prolina y los AMP ricos en glicina. Estos cuatro tipos de AMP están encargados de proteger al huésped destruyendo las membranas celulares bacterianas e inhibiendo la síntesis de proteínas. (Bulet, *et. al*, 1999).

Es hoy en día una de las mayores amenazas para la salud pública del mundo ya que, al llegar a la época denominada “era post antibiótica”, donde ningún ATM tendría lugar en el tratamiento y las infecciones serían mortales. Además, el gran flujo de movimiento de las personas, tanto a nivel nacional e internacional, agrava el problema debido a la diseminación de gérmenes resistentes. Aunque la resistencia es una

evolución natural, el uso irracional e inadecuado de antibióticos tanto en el ser humano, animales y agricultura están acelerando este proceso (Angles, 2018).

En el 2016, un grupo de expertos de una comisión denominada “Review on Antimicrobial Resistance” dio un informe después de un extenso trabajo donde se analiza desde un punto de vista global el aumento de la resistencia bacteriana a fin de proponer acciones concretas para enfrentar dicha resistencia a los antimicrobianos en todo el mundo. Uno de los principales datos que se observa en este informe es que para el año 2050, el número de muertes atribuibles a la resistencia bacteriana se acercará a los 10 millones de personas por año; más que la diabetes, accidentes de tráfico, e incluso ganándole al cáncer. Esta cifra representa el equivalente a la ciudadanía de países como Suecia, República Checa, Grecia o Portugal (Pérez, 2021).

Los halos de inhibición mostrados en contra de las bacterias *Staphylococcus aureus* por el antibiótico Amoxicilina como control positivo, y para *Salmonella enteritidis* por el antibiótico Azitromicina, se evidencia que fue mucho más efectivo para *S. aureus* que en *Salmonella enteritidis*.

Por último, en la cuantificación de proteínas, se empleó la absorción A280 nm. Dicha cuantificación está basada en la absorción en la región de UV, posee la ventaja de que no es necesario utilizar reactivos por lo que la muestra no se daña o destruye durante la determinación. Sin embargo, hay desventajas como interferencias de compuestos que contengan anillos de purina y pirimidina. (Navarro, 2017)

Como se observa en la figura 34, las muestras del municipio de La Argentina poseen el doble de cantidad de proteínas que el veneno del municipio de La Plata. Sin embargo, el segundo tuvo mayor eficacia en cuanto a su actividad antimicrobiana contra los patógenos estudiados. Esto es probablemente consecuencia del tipo de proteínas presentes en cada uno, es decir, en el veneno de La Plata podría haber mayor presencia de proteínas antibacterianas como Fosfolipasa A₂, Fosfatasa ácida, Serina proteasa, Bombolitinas entre otros peptidos que aun no han sido identificados; además de la presencia de la arginina quinasa, un componente conocido del veneno de arañas y avispas parasitarias (Van Vaerenbergh, *et. al*, 2015).

En estudios futuros, se puede usar diferentes especies para evaluar el efecto directo de la altitud, la vegetación y la población de presas en la composición del veneno de los abejorros. Quiu, *et. al*, (2012) en su investigación:

Hallaron que las bombolitinas de *M. pennsylvanicus* y *B. lapidarius* están compuestas por 17 y 19 aminoácidos, respectivamente, mientras que la bombolitina de *B. ignitus* está compuesta por 18 aminoácidos, un péptido de 56 aminoácidos era el mismo que el gen de la bombolitina de *B. ignitus* con la excepción del tamaño del intrón. Además, la secuencia de aminoácidos de Bt-bombolitina es idéntica a la de *B. ignitus* bombolitina. En conjunto, estos resultados indican que la bombolitina Bt se produce en la glándula del veneno, se escinde para formar un péptido maduro de 18 aminoácidos y luego se almacena en el saco del veneno.

Según lo investigado por Wang, *et. al*, (2021) logró lo siguiente:

Identificaron por primera vez un gen antipéptido, la abaecina, del abejorro *B. lantschouensis*. La abaecina juega un papel importante en el desarrollo y la reproducción de los abejorros. La expresión inducible de la abaecina ayuda a los abejorros a eliminar los patógenos invasores. La abaecina se expresa en el testículo, la epidermis, el músculo, el intestino medio, el cuerpo graso y la glándula del veneno.

VIII. Conclusiones

Los hoteles artificiales para abejorros con esencias de la pasiflora son herramientas muy útiles y efectivas para atraer la atención de estos individuos ya que, se logró apreciar que en los lugares donde se implementaron estas estructuras en el municipio de La Plata, hubo mayor presencia de abejorros con un promedio de 41 durante un día, en comparación con La Argentina, donde se colectaron 20 individuos en el mismo periodo de tiempo, sin el empleo de hoteles.

Se extrajeron 103 μL de veneno correspondiente a 107 glándulas: 80 en el municipio de La Plata (78,71 μL) y 27 en el municipio de la Argentina (24,31 μL).

La evaluación antimicrobiana del veneno del *Bombus cf atratus* mostró potencial inhibitorio contra *Staphylococcus aureus*, ya que se obtuvieron halos de inhibición de 9,30 mm a 159 ppm ($s=0,35$), pero en el caso de la bacteria Gramnegativa *Salmonella enteritidis* no mostró presencia de halos de inhibición, por lo cual se recomienda aumentar la concentración para futuras investigaciones. Así mismo, se logró apreciar que el veneno de La Plata fue más efectivo que el de La Argentina dado que, presentó inhibición (8,95 mm) a una concentración (50 ppm) ($s= 0,09$) en comparación con el antibiótico empleado como control, el cual presentó un halo de inhibición de 20,20 mm ($s= 0,52$) para *S. aureus*. Por consiguiente, es viable ampliar las investigaciones sobre venenos de abejorro como alternativa a esta gran problemática.

Por último, al momento de cuantificar sus proteínas, se observa que el veneno del municipio de La Argentina supera al veneno de La Plata en cantidad de proteínas, por lo

que, se supone que esta anomalía se debe al tipo de péptidos presentados en cada muestra.

Se recomienda realizar ensayos de evaluación antimicrobiana con cepas puras para comprobar los resultados de resistencia y susceptibilidad de las bacterias frente al veneno del Bombus.

IX. Referencias

- Abrahamovich, A., & Díaz, N. (2007). Identificación de las “abejas sociales” del género *Bombus* (Hymenoptera, Apidae) presentes en la Argentina: clave pictórica, diagnosis, distribución geográfica y asociaciones florales. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 106(2), 165-176. Obtenido de <https://core.ac.uk/download/pdf/15772884.pdf>
- Aguado, L., Fereres, A., & Viñuela, E. (2017). *Guía de campo de los polinizadores de España*. España: Syngenta.
- Aguilar, S. (2016). *Evaluación de la eficiencia de las cajas nido para abejas (“Bee Hotels”) como herramienta de restauración y rescate de restauración y rescate de polinizadores*. Andalucía: Universidad de Jaén.
- Alfaro, R. (2018). Aspectos relevantes sobre *Salmonella enteritidis* en humanos. *Rev Cubana Med Gen Integr*, 34(3), 110-122. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubmedgenint/cmi-2018/cmi183l.pdf>
- Aldana, J., Cure, J., Almanza, M., Vecil, D., & Rodríguez, D. (2007). Efecto de *Bombus atratus* (Hymenoptera: Apidae) sobre la productividad de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bajo invernadero en la Sabana de Bogotá, Colombia. *Agronomía Colombiana*, 25(1), 62-72.
- Álvarez, J. (2001). Alergia a Venenos Naturales (Himenópteros). *Medicine*, 8(36), 7.
- Angles, E. (2018). Uso racional de antimicrobianos y resistencia bacteriana ¿hacia dónde vamos? *Med Hered*, 29, 2.

- Ascher, J., & Pickering, J. (1 de Febrero de 2020). *Discover Life bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila)*. Obtenido de http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species
- Barkan, N., Bayazit, M., & Demiralp, D. (2017). Proteomic Characterization of the Venom of Five Bombus (Thoracobombus) Species. *Toxins*, 9(362), 9.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.-L., & Hoffman, D. (1999). péptidos antimicrobianos en insectos; estructura y función. *Developmental & Comparative Immunology*, 23, 15.
- Bush, L. (15 de Marzo de 2015). *Manual MSD*. Obtenido de <https://www.msmanuals.com/es-co/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-bacterias-grampositivas/infecciones-por-staphylococcus-aureus>
- Brooks, G., Butel, J., Carrol, K., Morse, S., & Mietzner, T. (2011). *Microbiologia Medica* (26 ed.). Santa Fe: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A.
- Brooks, G., Carrol, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, T. (2011). *Microbiología médica*. México: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.
- Carhuapoma, V., Valencia, N., Huamán, T., Paucar, R., Hilario, E., & Huere, J. (2020). Resistencia Antibiótica de *Salmonella* spp, *Escherichia coli* Aisladas de Alpacas (*Vicugna pacus*) con y sin Diarrea. *Ciencias de la Vida*, 31(1), 10.
- Choo, Y. M., Lee, K. S., Yoon, H. J., Je, Y. H., Lee, S. W., Sohn, H. D., & Jin, B. R. (2010). Molecular cloning and antimicrobial activity of bombolitin, a component of bumblebee *Bombus ignitus* venom. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 6.

- Choi, Y. S., Choo, Y. M., Lee, K. S., Yoon, H. J., Kim, I., Je, Y. H., . . . Jin, B. R. (2008). Cloning and expression profiling of four antibacterial peptide genes from the bumblebee *Bombus ignitus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 6.
- Comité de Alergia a Himenópteros. (2021). *Alergia a Himenópteros*. Madrid: ERGON.
- Correa, J., & Giraldo, S. (2019). *Apicidido, el Zumbido del Exterminio*. pereira: Universidad Católica de Pereira .
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (1 de Enero de 2022). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Obtenido de Eucast: <http://www.eucast.org>.
- Fernández, E., & Galván, A. (2017). Métodos para la cuantificación de proteínas. *Bioquímica y Biología Molecular*, 7.
- Frágenas, N., Franco, A., & Peraza, G. (2017). *Informe de la Familia Staphylococcaceae y Micrococcaceae*. Caracas: Universidad Central de Venezuela.
- Freire, J., & Sato, L. (1999). Conservación de Cultivos de Rizobios. *Revista Latinoamericana de Microbiología* , 45.
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. (2013). *Staphylococcus aureus*. *elika*, 4.
- Gamboa, V., Ravoet, J., Brunain, M., Smagghe, G., Meeus, I., Figueroa, J., & Riaño, D. (2015). Bee pathogens found in *Bombus atratus* from Colombia: A case study. *Journal of Invertebrate Pathology*, 129, 36-39.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.05.013>

- García, H., & Vázquez, R. (1998). Cuantificación de Proteínas: Una Revisión. *Biotecnología*, 3, 13.
- García, J., Cantón, R., García, J. E., Gómez, L., Martínez, L., Rodríguez, C., & Vila, J. (2000). *Métodos Basicos para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos*. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- González, C. (11 de Septiembre de 2011). *Reserva Ecológica Costanera Sur*. Obtenido de <https://www.reservacostanera.com.ar/abejorro---Bombus-spp-1>
- Granados , R., & Villaverde, C. (2003). *Microbiologia* (1° edición ed.). Madrid: Ediciones Parainfo S.A.
- Herrera, M. L. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana Metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 34, 7.
- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucio, M. (2014). Definiciones de los Enfoques Cuantitativo y Cualitativosus Similitudes y Diferencias. En *Metodología de la Investigación* (Sexta ed., págs. 5-6). México D.F.: McGraw Hill.
- Kwon, Y., & Saeed, S. (2003). Effect of temperature on the foraging activity of *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae) on greenhouse hot peeper (*Capsicum annum* L.). *Appl. Entomol. Zool.*, 38(3), 275-280.

- Lawe, O., & Bennett, S. (27 de Febrero de 2017). *Organización Mundial de la Salud*.
Obtenido de OMS: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Martínez, B. C. (2012). Algunos Conceptos sobre Muestreo. En *Estadística y Muestreo* (Décima tercera ed., pág. 900). Bogotá: ECOE Ediciones.
- Ministerio de la Protección Social Instituto Nacional de Salud UERIA. (2011). Perfil de riesgo *Salmonella* spp. (no tifoideas) en pollo entero y en piezas. 137.
- NanoDrop Products. (2010). Protein A280 Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers. *Thermo Fisher Scientific*, 32.
- Navarro, Y. (2017). *Determinación de las Proteínas*. Piura: Universidad Nacional de Piura.
- Olejniak, N. (2014). ArgentiNat, Ramos Mejia.
- Olascoaga, K. S., Sánchez, G., Carmona, I., Galicia, M. d., Gómez, A., Islas, S., & Castañeda, J. (2018). Péptidos antimicrobianos, una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Gaceta Médica de México*, 8.
- O'Toole, C., & Raw, A. (1999). *Bees of the world*. Cassell Illustrated.
- Padilla, S., Silva, C., & Cure, J. (2020). Recursos florales utilizados por el abejorro nativo *Bombus atratus*. *Rev. Facultad de Ciencias Básicas.*, 16(1), 69-78.
- Parra, A., & Nates, G. (2007). Variación de la comunidad de abejas de las orquídeas (Hymenoptera: Apidae) en tres ambientes perturbados del piedemonte llanero colombiano. *Revista de Biología Tropical*, 8.

- Park, H. G., Deng, Y., Lee, K. S., Kim, B. Y., Yoon, H. J., Lee, K. Y., & Jin, B. R. (2016). Molecular cloning and antifungal activity of an inhibitor cysteine knot peptide from the bumblebee *Bombus ignitus*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *19*, 6.
- Pinilla , M., Ospina, R., & Cure, J. (2016). *Bombus*: los abejorros del paramo. *ResearchGate*, 14.
- Pasachova , J., Ramírez , S., & Muñoz , L. (2019). Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova*, *17*(32), 25-38. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200025
- Pérez, M. T. (2021). *La Pandemia Silenciosa: Resistencia Bacteriana a los Antibióticos*. Madrid: CEU Ediciones.
- Qiu, Y., Choo, Y. M., Yoon, H. J., & Jin, B. R. (2012). Molecular cloning and antibacterial activity of bombolitin isolated from the venom of a bumblebee, *Bombus terrestris*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *15*, 5.
- Qiu, Y., Chen, Y., Yu, H., Zhou, Q., Wang, R., Jin, M., & Kong, D. (2017). Molecular cloning of the *Bombus terrestris* bumblebee venom protein phospholipase A2 and its anti-leukemia effects on K562 cells. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *20*, 6.
- Reynaldi, F., Albicoro, Albicoro, F., Pecoraro, M., & Galosi, C. (2013). First molecular detection of co-infection of honey bee viruses in asymptomatic *Bombus atratus*

- in South America. *Brazilian journal of biology*, 73(5), 797-800. Obtenido de <https://www.scielo.br/j/bjb/a/k74dWBVQbf8cR4wTfyGc8JM/?format=pdf&lang=en>
- Riaño, D., & Cure, J. R. (2016). Efecto letal agudo de los insecticidas en formulación comercial Imidacloprid, Spinosad y Thiocyclam hidrogenoxalato en obreras de *Bombus atratus* (Hymenoptera: Apidae). *Biología Tropical*, 64(4), 10.
- Rončević, T., Puizina, J., & Tossi, A. (2019). ¿Los péptidos antimicrobianos como agentes antiinfecciosos en la era pre-post-antibiótica? *Molecular Sciences*, 32.
- Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2008). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Instituto de Higiene de la Universidad de la República*, 663-671.
- Téllez, L., & Posada, F. (2013). Curaduría e Identificación de la Fauna de *Bombus* de la Colección de Entomología de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales u.d.c.a. *U.D.C.A*, 16(2), 9.
- Valenzuela, A. (24 de Marzo de 2013). *¿Son los abejorros los machos de las abejas?* Obtenido de RTVE: <https://www.rtve.es/noticias/20130324/son-abejorros-machos-abejas/623180.shtml#:~:text=Tanto%20los%20machos%20de%20las,exclusivamente%20inseminar%20a%20la%20reina>
- Van Vaerenbergh, M., Debyser, G., Smagghe, G., Devreese, B., & de Graaf, D. C. (2015). Unraveling the venom proteome of the bumblebee (*Bombus terrestris*) by integrating a combinatorial peptide ligand library approach with FT-ICR MS. *Toxicon*, 102, 8.

- Wang , P., She, G., Yang, Y., Li, Q., Zhang, H., Liu, J., . . . Lei , H. (2012). Synthesis and Biological Evaluation of New Ligustrazine Derivatives as Anti-Tumor Agents. *Molecules*, *17*(5), 4972-4985. doi:10.3390/molecules17054972
- Wang, L., Dong, K., He, S., Jilian, L., Jie, W., & Jiaying, H. (2021). Cloning and characteristics of the antibacterial peptide gene abaecin in the bumblebee *Bombus lantschouensis* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *24*(1), 369–375. Obtenido de <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/j.aspen.2021.01.013>
- Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., & Woods, G. (2006). *Koneman Diagnostico microbiológico*. Madrid: Editorial Medica Panamericana, s.a.
- Wirtanen, G., & Salo, S. (2016). Riesgos del biofilm. *Manual de Control de Higiene en la Industria Alimentaria (Segunda Edición)*, 24.
- Yoon, K. A., Park, Y. H., Koh, Y. H., & Lee, S. H. (2017). Bioactivity and molecular characterization of bombolitins from *Bombus ardens*, *B. consobrinus*, *B. terrestris* and *B. ussurensis*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *20*, 7.

Anexos

Anexo 1

Certificado de Presentaciones al encuentro Departamental de Semilleros




SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN
Gestores de Conocimiento
 CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN


A través del convenio de cooperación especial No. 8 de 2020 para el fortalecimiento de las capacidades en ciencia, tecnología e innovación de los semilleros de investigación

Certifica que:
Diego Alexander Fuquene Medina
 Identificado con documento No.
1.080.266.803
 participó en las jornadas de conferencias denominadas
Diálogos en Ciencia, Tecnología e Innovación,
 donde se abordaron temáticas relacionadas con Semilleros de Investigación, Ética y Bioética en la Investigación, Formulación de Proyectos y Apropriación Social del Conocimiento,
 desarrolladas del 6 al 8 de abril de 2022.
 Dado en Neiva a los 19 días del mes de abril de 2022


Olga Patricia Sánchez Rubio
 Presidenta RedIES Huila


Diego Andrés Montenegro Garza
 Director proyecto gestores de Conocimiento





SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN
Gestores de Conocimiento
 CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN


A través del convenio de cooperación especial No. 8 de 2020 para el fortalecimiento de las capacidades en ciencia, tecnología e innovación de los semilleros de investigación

Certifica que:
Lorena Silva Merchán
 Identificado con documento No.
1.075.319.242
 participó en las jornadas de conferencias denominadas
Diálogos en Ciencia, Tecnología e Innovación,
 donde se abordaron temáticas relacionadas con Semilleros de Investigación, Ética y Bioética en la Investigación, Formulación de Proyectos y Apropriación Social del Conocimiento,
 desarrolladas del 6 al 8 de abril de 2022.
 Dado en Neiva a los 19 días del mes de abril de 2022


Olga Patricia Sánchez Rubio
 Presidenta RedIES Huila


Diego Andrés Montenegro Garza
 Director proyecto gestores de Conocimiento

