



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CARRERA: QUÍMICA FARMACÉUTICA

MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO (A)

EN: QUÍMICA FARMACÉUTICA

TITULO:

Efecto antibacteriano in vitro de la miel producida por la abeja

***Apis mellífera* en microorganismos Gram + y Gram -, en los laboratorios del departamento de Bioanálisis clínico I.P.S. Marzo-Diciembre del año 2018 UNAN-MANAGUA.**

Autores:

Br (a): Yennifer Gissel Valle Pilarte.

Br: Gustavo Adolfo Méndez Téllez.

Br (a): Blanca del Carmen Suarez González.

Tutora:

MSC. Martha Xiomara Guerrero Delgado

Managua- enero -2019

1-Título:

Efecto antibacteriano de la miel producida por la abeja

***Apis mellífera* en microorganismos Gram + y Gram -, en los laboratorios**

del departamento de Bioanálisis clínico I.P.S. Marzo-Diciembre del año

2018 UNAN-MANAGUA

Dedicatoria

Yennifer Gissel Valle Pilarte:

Dedico esta monografía primeramente a Dios por brindarme la salud, fortaleza y sabiduría necesaria para superarme.

A mi padre **Enrique José Valle Corea** y a mi madre que en paz descansa **Urania de los Ángeles Pilarte Pérez**, quienes son mi principal motivo de superación y han sido siempre los que me han apoyado en las decisiones que he tomado y por el amor incondicional que me han brindado, por el apoyo económico que me han ofrecido todos estos años de estudios, permitiendo así cumplir mis metas y así tener un buen futuro; además por los valores que siempre me inculcaron para ser una persona íntegra y buena profesional.

A mi hermano **Yasser Hassel Valle Pilarte** que siempre me brindó su apoyo incondicional y me brindo sus consejos para que estudiara y alcanzara mis metas y así tener un buen futuro.

A mi novio **José David Muñoz Espinoza**, por brindarme amor incondicional todos estos años, por el apoyo que siempre me ha brindado en todas mis decisiones y en mi trabajo monográfico.

A todas estas personas dedico esta monografía, son las personas más importantes de mi vida los, amo mucho.

Gustavo Adolfo Méndez Téllez

Dedico este trabajo monográfico primeramente a Dios que siempre ha estado conmigo en todo momento dándome sabiduría y conocimientos y la fortaleza necesaria para poder superarnos.

A mis padres **Donald Ricardo Méndez Ramírez** y **Mercedes del Socorro Téllez Martínez**, quienes con mucho esfuerzo me han puesto en el escalón en el cual me encuentro brindándome todo su apoyo incondicional.

A cada uno de los maestros que me brindaron el pan del saber, en especial a la profesora **Natalia Gutiérrez** quien ya descansa en la paz del señor.

Blanca del Carmen Suarez Gonzales:

Dedico este trabajo monográfico a Dios, por darme la sabiduría, fuerza y valor, por ser el guía que ilumina todos los éxitos que he alcanzado en mi vida.

A mi familia por apoyarme en cada momento de mi vida, en especial a mis padres Luis **Alberto Rodríguez Suárez y María de la Cruz González** y Hermanos, con sus consejos y apoyo absoluto me han motivado continuamente a seguir adelante, con los conocimientos adquiridos, brindándome el fruto de su esfuerzo y sacrificio para ofrecerme un mañana mejor y a mi hijo **Ayssar Isaías Araya Suárez**, por ser mi deseo de superación y amor que me brindo en cada etapa de mi vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua y en especial a la **MsC. Rosa María González Tapia** Directora del Departamento de Química por apoyar en todo momento desde que elegimos formarnos como profesionales en esta casa de estudio.

A la profesora **MsC. Martha Xiomara Guerrero Delgado** por sus creativas orientaciones, por su valiosa tutoría incondicional y por transferir sus conocimientos, por sus aportaciones a este estudio.

También quiero dedicar a todos los profesores de esta casa de estudio que me transfirieron sus conocimientos y me brindaron facilidades sin ellos no sería posible realizar esta monografía.

Agradecimiento

Primeramente a Dios todo poderoso por brindarnos la salud y la sabiduría para poder alcanzar nuestra meta, ya que han sido años de esfuerzo y sacrificios.

A Nuestros padres infinitamente por estar siempre apoyándonos económicamente, por motivarnos a salir adelante y alcanzar nuestras metas.

A la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN-Managua por permitir formarnos como profesionales en esta casa de estudio.

A la **MsC. Martha Xiomara Guerrero Delgado** por su importante asesoría, apoyo y disposición en la realización de este trabajo monográfico.

Al **Msc. Jorge Luis Pitty** por su aporte incondicional en este trabajo monográfico.

Al laboratorio de Bioanálisis clínico, en especial a **María Inés Jirón Sequeira y Milena Paola Vargas Cruz**, por el apoyo prestado y por facilitar la utilización de las instalaciones, los equipos y materiales.

A la profesora **Indira Sofía Guevara López**, por su apoyo incondicional y su absoluta disposición en colaborar con el trabajo monográfico.

A la **MsC. Rosa María González Tapia** Directora del Departamento de Química, por apoyar en todo momento desde que iniciamos nuestro estudio.

Carta Aval del tutor(a)

*La miel es el producto elaborado por las abejas (*Apis mellifera*), constituye el único material endulzante que puede ser almacenado y usado tal cual es producido en la naturaleza. Las propiedades y beneficios de la miel de abeja han sido conocidos y utilizados por distintas sociedades a lo largo del tiempo. Actualmente esta sustancia constituye uno de los endulzantes naturales primarios más importantes, cuyos beneficios van desde un sabor agradable al paladar, hasta la posible prevención y tratamiento de enfermedades.*

En muchas partes del mundo la miel es utilizada como medicina o jarabe y como tratamiento especial para niños. La medicina moderna está aumentando el uso de la miel en una gran variedad de tratamientos. Las propiedades medicinales desde la antigüedad: como tratamiento terapéutico contra infecciones causadas por bacterias y hongos, en heridas abiertas, úlceras, quemaduras e infecciones oculares. La miel posee propiedades antibióticas: es una solución estéril con altas concentraciones de azúcar que previene el desarrollo de microorganismos. Es altamente ácida y contiene enzimas que producen peróxido de hidrógeno que elimina las bacterias. Sus propiedades higroscópicas ayudan a secar las heridas, y su permeabilidad permite que el oxígeno la atraviese.

Las características antibacteriales de la miel se deben en parte a su osmolaridad relacionada con su contenido de agua, su bajo pH, la presencia de peróxido de hidrógeno y algunos

componentes fitoquímicos específicos de las diferentes clases de plantas, las cuales le transfieren sus cualidades al néctar recolectado por la abeja.

*Uno de los objetivos del control Microbiológico es medir la susceptibilidad de los microorganismos generadores de infección y para validar estos ensayos se requieren de cepas controles certificadas ante los antimicrobianos naturales, semisintéticos y sintéticos, es por tal razón que surgió la motivación de realizar la investigación cuyo tema es **Efecto antibacteriano de la miel producida por la abeja *Apis mellifera* en microorganismos Gram + y Gram -, en los laboratorios del departamento de Bioanálisis clínico I.P.S. Marzo-Diciembre del año 2018 UNAN-MANAGUA**, este trabajo se ha enfocado en probar la efectividad de la miel como agente antibacteriano frente a la cepa de ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**, y ***Enterococcus faecalis* ATCC 11700** y ***Escherichia coli* ATCC 25922**. Considerando las aplicaciones que podría tener como alternativa a los antibióticos producidos en el mercado farmacéutico.*

Por lo que hago constar que la monografía cumple con los requisitos metodológicos y científicos técnicos, como tutora avalo a las autores de la misma para la presentación y defensa de la misma ante un jurado calificador.

Msc. Martha Xiomara Guerrero D.

Msc. Ciencias Farmacéuticas con orientación en Biología clínica.

Lic. Bioanálisis clínico

Ex Profesor titular, Polisal – UNAN Managua

Resumen

En este estudio Experimental, se evaluó el efecto antibacteriano de la miel de abeja *Apis mellifera* frente a las cepas bacterianas Gram + *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, y *Enterococcus faecalis* ATCC 11700 y Gram - *Escherichia coli* ATCC 25922.

Para identificar la susceptibilidad bacteriana se utilizó el método de disco difusión (método de Kirby y Bauer) y para determinar la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida se utilizó el método de dilución en caldo.

Se evidenció actividad bacteriostática contra las cepas bacterianas Gram +, siendo *Staphylococcus aureus* ATCC25923 quien presento mayor sensibilidad frente a la miel de abejas *Apis mellifera*, seguido de la cepa bacteriana Gram positiva *Enterococcus ATCC11700* faecalis. En la CMI solamente se presencié efecto inhibitorio, a una concentración de miel de 75mg/ml la cual se encontraba en el tubo número 8 de la serie de tubos.

En síntesis es importante mencionar que se llegó a concluir que hubo mayor efecto inhibitorio sobre la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* ATCC25923, por lo cual se recomienda el consumo de miel para tratar las diferentes afecciones de esta cepa bacteriana.

Palabras clave: Bactericida, Bacteriostática, Concentración, Peróxido de hidrogeno, Inhibina

Índice

CAPÍTULO I	17
1.1 Introducción	15
1.2 Planteamiento del problema.....	17
1.3 Justificación	18
1.4 Objetivos	19
CAPÍTULO II	20
2.1 Marco referencial	21
2.1.1 Antecedentes.....	21
2.2 Marco teórico	25
2.2.1 Miel de abejas.....	25
2.2.2 Características de la miel de abeja.....	26
2.2.3. Efecto antibacteriano de la miel.....	26
2.3. Bacterias Gram +	28
2.3.1. Genero <i>Staphylococcus aureus</i>	28
2.3.2. Características de la especie <i>Staphylococcus aureus</i>	29
2.3.3. Resistencia de <i>Staphylococcus aureus</i> a los antimicrobianos.....	30
2.3.4. Género <i>Enterococcus faecalis</i>	31
2.3.5. Características generales del género <i>Enterococcus faecalis</i>	31
2.3.6. Resistencia de <i>Enterococcus</i> a los antimicrobianos.....	32

2.4. Bacterias Gram -	33
2.4.1 Genero <i>Escherichia coli</i>	33
2.4.2. Resistencia de <i>Escherichia coli</i> a los antibióticos.....	34
2.5. Método de difusión agar o método de (kirby y bauer).....	35
2.6. Espectro de susceptibilidad.....	36
2.6.1. Sensibilidad.....	36
2.6.2. Resistencia.	36
2.6.3. Sensibilidad intermedia.....	36
2.7 Método de dilución en caldo.....	37
2.7.1 .Concentración inhibitoria mínima.	38
2.7.2. Concentración bactericida mínima.	38
2.8 Marco conceptual.....	39
2.9. Marco legal.	42
2.9.1. Definición (NCCLS).....	42
2.9.2 Macrodilución en caldo.	45
2.9.3 Método de disco difusión.....	46
2.9.4 Cepas de referencia utilizadas en pruebas de susceptibilidad.....	47
2.9.5 Hipótesis o preguntas directrices.	48
CAPÍTULO III	49
3.1. Diseño metodológico/ Marco metodológico.....	50
3.1.1. Descripción del ámbito de estudio.....	50

3.1.2. Tipo de estudio (según el o los métodos).	50
3.1.3. Población y muestra.....	51
3.1.4. Variables y Operacionalización.....	52
3.2 Método	58
3.2.1 Método para preparar agar sangre.	58
3.2.2 Método para preparar agar Mac Conkey.	59
3.2.3 Recuperación de bacterias.	59
3.2.4. Realización de siembra. (Inoculación).....	59
3.2.5 Incubación.....	60
3.2.6. Observación de pureza de cultivos.	60
3.2.7 Preparación de las diluciones de la miel.....	60
3.3. Cálculos.....	61
3.4 Método de disco difusión (método de Kirby y Bauer).....	63
3.5 Método de dilución en caldo.....	66
3.5.1. Evaluación del Efecto Antibacteriano	67
3.5.2. Escala de Duraffourd:	67
3.6 Materiales para recolectar la información.....	68
3.6.1. Materiales para procesar la información.....	68
3.6.2. Método o métodos a utilizar (según el tipo de estudio).....	68
CAPÍTULO IV	69
4.1 Análisis de los resultados	70

CAPITULO V	75
5.1 Conclusiones.....	76
5.2 Recomendaciones	77
5.3 Bibliografía	78
5.4 Anexos	82
5.5. Glosario.....	114

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de las variables.....	53
Tabla 2. Material y método.....	56
Tabla 3: Halos de inhibición para <i>Staphylococcus aureus</i>	98
Tabla 4: Halos de inhibición para <i>Enterococcus faecalis</i>	99
Tabla 5: Halos de inhibición para <i>Escherichia coli</i>	100
Tabla 6: Clasificación como sensible, resistente e intermedio según la escala Duraffourd para <i>Staphylococcus aureus</i> frente la miel de abeja <i>Apis mellifera</i>	101
Tabla 7: Clasificación como sensible, resistente e intermedio según la escala Duraffourd para <i>Enterococcus faecalis</i> frente la miel de abeja <i>Apis mellifera</i>	102
Tabla 8: Clasificación como sensible, resistente e intermedio según la escala Duraffourd para <i>Escherichia coli</i> frente la miel de abeja <i>Apis mellifera</i>	103
Tabla 9: Ficha de laboratorio	104
Tabla 10: Ficha de laboratorio	106
Tabla 11: Ficha de laboratorio	107
Tabla 12: Patrones estándar del halo de inhibición y diámetro del halo de inhibición para la cepa <i>E. coli</i> ATCC 25922 empleada como control de calidad, elaborado con datos del NCCLS.....	108
Tabla 13: : Patrones estándar del halo de inhibición para estafilococos y diámetro del halo de inhibición para la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 empleada como control de calidad, elaborado con datos del NCCLS.....	109

INDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Estructura de la pared celular de las bacterias Gram-positivas.	82
Ilustración 2: Estructura de la pared celular de las bacterias Gram- negativa.	83

ÍNDICE DE FOTOS

Foto 1. Realizando cálculos para obtener la cantidad de miel a pesar.	84
Foto 2: Muestra de miel de abeja <i>Apis mellifera</i> utilizada en el estudio.	85
Foto 3: Pesando la miel para preparar las diluciones.	86
Foto 4: Preparación de las diluciones de la miel.	87
Foto 5: Diluciones de la miel preparadas.	88
Foto 6: Preparación de los inóculos para la técnica de dilución en caldo.	89
Foto 7: Sensidiscos impregnados con las diferentes concentraciones de miel.	90
Foto 8: Colocando los sensidiscos con las diferentes concentraciones en los platos Petri que contienen cada una de las bacterias.	91
Foto 9: Halos de inhibición para <i>Staphylococcus aureus</i> obtenidos en la prueba de antibiograma.	92
Foto 10: Halos de inhibición para <i>Enterococcus faecalis</i> obtenidos en la prueba de antibiograma.	93
Foto 11: Halos de inhibición para <i>Escherichia coli</i> obtenidos en la prueba de antibiograma.	94
Foto 12: Prueba de dilución en caldo para determinar la CIM y la CBM en <i>Staphylococcus aureus</i>	95
Foto 13: Prueba de dilución en caldo para determinar la CIM y la CBM en <i>Enterococcus faecalis</i>	96
Foto 14: Prueba de dilución en caldo para determinar la CIM y la CBM en <i>Escherichia coli</i>	97

INDICE DE GRAFICOS

Grafico 1. : Tamaño de halo de inhibición vs concentración de miel de abejas <i>Apis mellifera</i> para <i>Staphylococcus Aureus</i>	110
Grafico 2 Tamaño de halo de inhibición vs concentración de miel de abejas <i>Apis mellifera</i> para <i>Enterococcus faecalis</i>	111

INDICE DE IMAGEN

Imagen 1: Abeja <i>Apis mellifera</i> libando las flores más comunes de los alrededores de la laguna de apoyo.....	105
Imagen 2: Abeja <i>Apis mellifera</i> libando las flores más comunes de los alrededores de la laguna de apoyo.....	112

CAPÍTULO I

1.1 Introducción

El uso indiscriminado de antibióticos, ha provocado un crecimiento en cuanto a la resistencia de bacterias a los antimicrobianos en la actualidad, existiendo la posibilidad de utilizar la miel de abejas *Apis mellifera* como alternativa en el tratamiento de afecciones provocadas por bacterias dado a sus propiedades antibacterianas; de ahí la importancia del tema que pretende demostrar que la miel de abeja posee efecto antibacteriano frente a las cepas bacterianas Gram + *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 11700 y Gram - *Escherichia coli* ATCC 25922.

Desde hace miles de años la miel ha sido utilizada como medicina y cuyas propiedades curativas han sido bien documentadas; sin embargo la medicina moderna siempre le ha dado la espalda a la efectividad de la miel como tratamiento medicinal, su vigencia confirmada por variadas investigaciones, reafirma hoy su amplio espectro curativo, incluso con ventajas sobre fármacos de la industria farmacéutica.

Hay numerosos investigadores que han reportado la efectividad de la miel como antibacteriano, por ejemplo: En el estudio de **Aguilera 2009**, evaluaron la actividad antimicrobiana de la miel, utilizaron cepas ATCC de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, comprobaron que la miel diluida y sin diluir posee mayor efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus*, mientras que no se observó inhibición del crecimiento de las cepas de *Escherichia coli* a ninguna concentración.

Por otro lado **Becerra 2016**, determino el efecto antibacteriano de la miel de abeja en diferentes concentraciones frente al *Staphylococcus aureus*, concluye que la actividad bactericida de la miel frente al *Staphylococcus aureus* es muy efectiva y constataron que la miel a mayor concentración mayor efecto antibacteriano sobre el *Staphylococcus aureus*.

Es por tal razón, que este trabajo se ha enfocado en evaluar el efecto antibacteriano de la miel de abeja *Apis mellifera* como agente antibacteriano sobre las bacterias **Gram +** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 11700 y **Gram -** *Escherichia coli* ATCC 25922, considerando las aplicaciones y beneficios que podría tener en la población debido a su bajo costo y diversas propiedades medicinales que posee la miel como alternativa a la resistencia desarrollada por las bacterias a los antibióticos producidos por la industria farmacéutica; estos últimos sin ser desplazados por la miel.

1.2 Planteamiento del problema

La problemática del uso indiscriminado de los antibióticos ha provocado que muchas bacterias presenten resistencia a estos. Ante esta realidad, en los últimos años se ha incentivado la búsqueda de tratamientos alternativos, lo que ha llevado al uso de la miel de abejas *Apis mellifera*, dadas sus propiedades antimicrobianas, cicatrizantes, antisépticas, astringentes y suavizantes.

Las propiedades medicinales de ésta han sido reconocidas desde tiempos antiguos. Tradicionalmente la miel de abeja se ha utilizado para tratar muchos tipos de infecciones sin que se tengan datos de su acción específica, por lo que en este trabajo pretendemos demostrar el efecto antibacteriano de la miel de abejas *Apis mellifera*, sobre microorganismos Gram + *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 11700 y Gram - *Escherichia coli* ATCC 25922.

Por lo tanto se plantea la siguiente pregunta del problema de investigación: ¿Tiene efecto antibacteriano la miel de las abejas *Apis mellifera* sobre las cepas bacterianas seleccionadas para el estudio y dar salida a la posible resistencia de las mismas, ante antibióticos sintéticos y ser utilizada como tratamiento alternativo?

1.3 Justificación

Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar el efecto antibacteriano in vitro de la miel de abeja *Apis mellífera* en microorganismos Gram + y Gram - utilizados en el estudio, pretendiendo que la miel sea utilizada como terapia o tratamiento alternativo para el tratamiento de afecciones causadas por las bacterias seleccionadas para el estudio.

Se pretende que este estudio sea de utilidad en la población facilitando de esta manera mayor accesibilidad a tratar enfermedades causadas por las bacterias seleccionadas en el estudio, beneficiando así a la población en general debido a sus propiedades curativas de origen natural e inocuas para el organismo humano sin riesgo de presentar reacciones adversas o interacciones medicamentosas .

Este estudio quedara a disposición de futuros investigadores que buscan efectos positivos y deseen realizar el estudio in vivo; se espera que surjan nuevas investigaciones a partir de este estudio que puedan dar un aporte a la salud de la población en general.

1.4 Objetivos

Objetivo General:

- Evaluar el efecto antibacteriano de la miel de abejas *Apis mellífera* en microorganismos Gram positivos y Gram negativos, en el laboratorio de docencia del departamento de Bioanálisis clínico I.P.S ubicado en los pabellones de medicina de la UNAN-MANAGUA.

Objetivos Específicos:

- Identificar la susceptibilidad de los microorganismos Gram + y Gram – frente a la miel en estudio.

- Determinar el valor de la concentración inhibitoria mínima (C.I.M) de la miel de abeja *Apis mellífera* frente microorganismos: Gram + *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 11700 y Gram - *Escherichia coli* ATCC 25922.

- Detectar el valor de la concentración mínima bactericida (C.B.M), de la miel producida por la abeja *Apis mellífera* en microorganismos: Gram + *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 11700 y Gram - *Escherichia Coli* ATCC 25922.

CAPÍTULO II

2.1 Marco referencial

2.1.1 Antecedentes.

En la Universidad nacional autónoma de Nicaragua Unan Managua, en el año 2016 se realizó un estudio acerca del ácido hialurónico versus miel de abeja como tratamientos aceleradores del proceso post-extracción en pacientes atendidos en cirugía oral III en la clínica odontológica de la Unan Managua, realizado por Learsi Lemonda Alonso, Claudia Alfaro Manzanares y Nora Carranza Velásquez, en este estudio se obtuvieron resultados donde la miel presentó excelente efecto cicatrizante, siendo el ácido hialurónico y la miel estadísticamente significativos ya que la variable respuesta tipo de tejido en este estudio respondió bien a ambos tratamientos obteniendo un $(P=0,0001)$ mayor que el nivel alfa de comparación (0.05).

Castillo, 2015. En la universidad nacional autónoma de Nicaragua se realizó un estudio acerca del uso de la miel no procesada para la curación de ulcera por presión en pacientes atendidos en el hospital Escuela Antonio Lenin Fonseca, en este estudio se obtuvieron los siguientes resultados. Se observó una mejoría clínica evidente en el grupo de pacientes que recibieron tratamiento con miel, con una reducción del tiempo de eliminación de la fetidez, reducción del exudado y aparición de tejido de granulación, en al menos 50 % del tiempo en comparación con el grupo que recibieron tratamientos con ácido acético. Es decir la miel consigue una rápida eliminación del olor en la herida, mejora la granulación y la epitelización, reduce los exudados y favorece la esterilización de las heridas, por lo tanto el uso de la miel

para tratamiento de ulcera, herida y quemaduras debe considerarse una alternativa a los métodos de cura habituales.

A continuación se menciona algunos de los estudios realizados a nivel internacional que están relacionados con el estudio que se realizara el cual es la determinación del efecto antibacteriano de la miel de abeja *Apis mellifera*.

Aguilera, 2009 Evaluaron la actividad antimicrobiana de nueve mieles venezolanas, en el estudio utilizaron cepas *ATCC de Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Las mieles se utilizaron concentradas y diluidas (1:2; 1:4; 1:8). Se observó la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* en todas las mieles utilizadas sin diluir y diluido al 1:2, mientras que no se observó inhibición del crecimiento de las cepas de *Escherichia coli* a ninguna concentración.

Pasco & Sanchez, 2010 Determinaron el efecto antibacteriano in vitro de miel de abejas *Apis mellifera* en cepas de *Streptococcus mutans* mediante la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB).

Para realizar dicha investigación, enfrentaron las cepas de *Streptococcus mutans* con la miel de abejas a diferentes concentraciones (desde 1% hasta el 7%), mediante el método de turbidimetría en tubo con caldo tioglicolato, para la concentración mínima inhibitoria y por crecimiento en placa en agar tripticasa soya para la concentración mínima bactericida.

Concluyeron en que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la miel de abejas en cepas de *Streptococcus mutans* es de 5.5% y la concentración mínima bactericida (CMB) de la miel de abejas en cepas de *Streptococcus mutans* es de 7%.

Bautista, 2011 Analizo el efecto antibacteriano de la miel de abeja en diferentes concentraciones sobre el *Estreptococos mutans*. Para este estudio utilizo el método disco difusión el cual fue necesario 50 placas petri con *Estreptococos mutans* a las que aplicaron miel de abeja en concentraciones de 5%, 10%, 20%, 30% y 100%. Lo dejó incubar por 24 horas a 37°C para luego observar el efecto antibacteriano midiendo el halo de inhibición (mm).

Al comparar el promedio de los halos de inhibición que se formó ante el *Estreptococos mutans* a diferentes concentraciones de miel de abeja, se encontró que el promedio del halo de inhibición al 5%, 10% y 20% fue 0 mm, sin embargo en la concentración del 30% subió a 11.4mm y a la concentración del 100% el halo de inhibición fue de 18.6mm.

Llegando a la conclusión que la miel de abeja a una mayor concentración produce mayor efecto antibacteriano sobre el *Estreptococo mutans*, la diferencia de promedios entre éstas cinco concentraciones mostró diferencia estadísticamente significativa.

Becerra, Cabrera, & Solano, 2016 Determinaron el efecto antibacteriano de la miel de abeja en sus diferentes concentraciones frente al *Staphylococcus aureus*, para este estudio utilizaron 6 cultivos de *Staphylococcus aureus* en caldo nutritivo con una determinada

cantidad de colonias a las cuales se aplicó miel de abeja en concentraciones de 30%, 60% y 100%. Concluyeron que la actividad bactericida de la miel frente al *Staphylococcus Aureus* es muy efectiva y pudieron constatar que la miel de abeja a una mayor concentración produce mayor efecto antibacteriano sobre el *Staphylococcus aureus*.

2.2 Marco teórico

2.2.1 Miel de abejas.

Según **Zamora, 2011**, define la miel de abeja como aquella sustancia producida por abejas melíferas a partir del néctar de las plantas, de secreciones de las partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos succionadores, las cuales son transformadas mediante sustancias específicas propias, deshidratadas y almacenadas en colmenas hasta su maduración.

Desde el punto de vista de su composición es una solución de glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, proteínas, minerales, ácidos orgánicos, vitaminas y enzimas. La proporción de sus componentes varía según el tipo de néctar con que ha sido producida, el cual está directamente relacionado con la flora apícola de la región.

Zamora Luis Gabriel, 2011 Indica que existen dos grandes grupos de abejas productoras de miel: aquellas con aguijón (*Apis mellifera*) y sin aguijón. Estas últimas pertenecen a la subfamilia Miliponinae, tribu Meliponini y Trigonini, y poseen una amplia distribución geográfica, encontrándose en las áreas tropicales y subtropicales del mundo.

Al comparar la miel de los melipónidos con la miel producida por *Apis mellifera*, se encuentra que ésta tiende a ser más líquida, más ácida y su composición no es idéntica, lo cual puede marcar una diferencia en el efecto que puedan presentar sobre los microorganismos.

Sin embargo, existe concordancia a nivel científico de que no todas las mieles poseen igual actividad antimicrobiana, esto es debido a los diferentes niveles de producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de factores no peróxido, los cuales son muy dependientes del origen de la miel, incluyendo la fuente del néctar, el área geográfica y el mismo procesamiento de la miel.

2.2.2 Características de la miel de abeja.

La miel es un fluido dulce y viscoso producido por las abejas *Apis Mellifera* a partir del néctar de las flores o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores de plantas. Las abejas lo recogen, transforman y combinan con la enzima invertasa que contiene la saliva de las abejas y lo almacenan en los panales donde madura.

2.2.3. Efecto antibacteriano de la miel.

La actividad antibacteriana de la miel está relacionada con las siguientes hipótesis:

Acidez (pH bajo): La miel presenta un pH que varía en la escala de 3.2 a 4.5. La acidez, beneficia la acción antibacteriana de los macrófagos, ya que un pH ácido dentro de la vacuola se relaciona con lisis bacteriana. La mayoría de las sustancias antimicrobianas de la miel se forman en el organismo de las abejas.

Saavedra, Chirinos, 2007 Habla acerca de la presencia de peróxido de hidrógeno: Producido por la enzima glucosil - oxidasa presente en la miel de abeja.

Osmolaridad: La miel por su concentración de glucosa es una sustancia hiperosmolar, con alta presión osmótica y baja actividad de agua "Aw"0.5 (16% agua) en un rango de temperatura de 4° a 37° C. El azúcar crea un medio con bajo contenido de agua (alta Osmolaridad), el cual hace que ninguna bacteria u hongo pueda desarrollarse.

Sin embargo, un componente importante son los Fitoquímicos, sustancias que provienen de la floración visitada por la abeja para la colecta del néctar. Dentro de éste grupo están los flavonoides, que presentan propiedades antioxidantes y antimicrobianas, y son reconocidos por inhibir un amplio rango de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Según **Saavedra, Chirinos, 2007, Jurgina, 2003** indican que la hipótesis más aceptada sobre el efecto antibacteriano de la miel de abeja se debe principalmente a la presencia de la enzima llamada "Inhibina" (enzima). Estas inhibinas consisten en peróxido de hidrógeno, flavonoides y ácidos fenólicos, además de otras sustancias aún sin identificar.

2.3. Bacterias Gram +

2.3.1. Genero *Staphylococcus aureus*.

El nombre del género *Staphylococcus* (del griego *staphyle-* racimo) se refiere a que las bacterias de ese grupo taxonómico son cocos agrupados de tal forma que semejan un racimo de uvas.

Los estafilococos son cocos Gram positivos, no esporulados, anaerobios facultativos que producen ácido a partir de glucosa tanto aeróbica como anaeróticamente. Todos los estafilococos producen catalasa, una enzima que convierte H_2O_2 en H_2O y O_2 , y es una prueba que permite distinguir a los estafilococos de los estreptococos.

Según **Albert, 2009** los *Staphylococcus* son resistentes a la sequedad y se dispersan con facilidad por partículas de polvo a través del aire y de las superficies. Los *Staphylococcus* son comensales y parásitos habituales de humanos y animales y pueden ocasionar serias enfermedades.

En humanos hay dos especies principales, *Staphylococcus epidermidis*, organismo no patógeno que se encuentra habitualmente en la piel o en las membranas de las mucosas y *Staphylococcus aureus*.

2.3.2. Características de la especie *Staphylococcus aureus*.

La morfología colonial es una característica muy útil que permite diferenciar inicialmente la especie *Staphylococcus aureus* de otras especies de estafilococos. Tras 24 horas de incubación crece formando colonias lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros.

Típicamente las colonias presentan una consistencia cremosa, con una coloración amarillenta o dorada, debido a la producción de un pigmento carotenoide. Otras especies de estafilococos ofrecen un aspecto variable, pero suelen ser de color blanco intenso.

Las cepas de *Staphylococcus aureus* que causan enfermedades producen factores de virulencia, entre ellos las hemolisinas que lisan los glóbulos rojos, como se aprecia en las colonias creciendo en placas de agar sangre. *Staphylococcus aureus* es capaz también de producir una enterotoxina asociada con enfermedades transmitidas por alimentos.

Otra sustancia producida por esta especie es la coagulasa, que causa la coagulación de la fibrina formando un coágulo, este factor ha sido asociado con la patogenicidad de la bacteria, ya que al acumularse la fibrina alrededor de la bacteria impide el contacto con los agentes inmunitarios del hospedador y evitando su fagocitosis.

La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* también producen leucocidina, una proteína que destruye los leucocitos, los glóbulos blancos. En las lesiones de la piel, como en

quemaduras y granos, la producción de leucocidina ocasiona una considerable destrucción de células del hospedador y es uno de los factores responsables de la formación de pus.

2.3.3. Resistencia de *Staphylococcus aureus* a los antimicrobianos.

Las bacterias pueden tener una resistencia natural o intrínseca a alguna(s) familias de antibióticos, la misma que ya está presente antes de que la bacteria se exponga al uso del agente terapéutico. Esta resistencia es dependiente de la variabilidad genética que sufre la bacteria en su evolución a través del tiempo.

Según **Echevarría Zarate, 2003**, este hecho ha podido ser comprobado al exponer a antibióticos cepas de bacterias halladas en las profundidades de los glaciares en las regiones árticas de Canadá, con más de 2,000 años de antigüedad, y que por tanto fueron 19 siglos precedentes al desarrollo de los antibióticos por el ser humano.

Por otro lado la resistencia a los antibióticos, también puede ser adquirida por la bacteria a través de mecanismos como la mutación, y la transmisión intra o inter especie por bacteriófagos o plásmidos.

2.3.4. Género *Enterococcus faecalis*.

Enterococcus son bacterias gram positivas que habitan en el interior del tracto gastrointestinal de una variedad de organismos, incluyendo al hombre. Pueden encontrarse también en el tracto genitourinario y en la saliva.

Han sido identificados como patógenos oportunistas para los humanos, pudiendo causar diferentes enfermedades dentro de las que se encuentran las endocarditis, bacteriemias enterococcicas, infecciones del tracto urinario, neonatales, del sistema nervioso central (aunque son raras), intra abdominal y pélvica.

2.3.5. Características generales del género *Enterococcus faecalis*.

(Barrow GI, 2010) Señala que antiguamente los enterococos pertenecían, clásicamente, a los *Streptococcus* grupo D de Lancefield. En el año 1970 fueron oficialmente clasificados por Kalina como un género independiente.

A partir de esta fecha el género *Enterococcus* es considerado un género separado del género *Streptococcus*.

(Perez, 2008) Asegura que la división de los géneros se basó en estudios taxonómicos y de ácidos nucleicos que demostraron su relación distante con *Streptococcus* y que permitieron considerarlos géneros diferentes.

Enterococcus son células esféricas u ovoides, de tamaño $0,6-2,0 \times 0,6-2,5 \mu\text{m}$. Son cocos Gram positivos, no formadores de endosporas. Se presentan en forma de pares o de cadenas cortas. Son no motiles, con excepción de las especies *E.gallinarum* y *E. casseliflavus*. Son anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, con metabolismo fermentativo.

Fermentan un amplio rango de carbohidratos con producción principalmente de L (+)- ácido láctico, pero no de gas, y producen un pH final de 4,2-4,6. Presentan requerimientos nutricionales complejos. Son catalasa negativos o más comúnmente, débilmente positivos.

Crecen usualmente en un caldo de cultivo a 10°C y 45°C , aunque el crecimiento óptimo es a 37°C . Pueden crecer a pH 9,6, con 6,5 % de NaCl y con 40 % de bilis. Usualmente fermentan la lactosa. Portan el antígeno D del grupo Lancefield y poseen el carbohidrato C. Sobreviven después del calentamiento a 60°C durante 30 min.

2.3.6. Resistencia de *Enterococcus* a los antimicrobianos.

(Fariñas & Torres, 2007) Señala que el género *Enterococcus* representa un desafío terapéutico debido a su resistencia Intrínseca, de carácter cromosómico y no transferible, a varios antibióticos, incluyendo cefalosporinas, meropenem, ertapenem, penicilinas resistentes a penicilinas, clotrimoxazol, aminoglicosidos y clindamicina.

La mayoría de los genes que codifican resistencia intrínseca residen en los Cromosomas. Además de la resistencia intrínseca, poseen gran capacidad para la adquisición de mecanismos de

resistencia y de genes de virulencia, ya sea a través de plásmidos, transposones conjugativos, intercambio cromosómico o mutaciones.

Debido a que *Enterococcus* son más resistentes a los agentes antimicrobianos, las opciones terapéuticas son más limitadas. Las cepas multirresistentes de *Enterococcus* se están convirtiendo en una amenaza, ya que algunas son resistentes a todos los antimicrobianos disponibles. Como la resistencia aumenta, el control de emergencia y la diseminación de estos microorganismos es indispensable.

Acosta, 2005 Indica que una de las medidas para disminuir la tasa de colonización y diseminación de *Enterococcus* sensibles y resistentes es limitar el uso irracional de los antimicrobianos. Otra medida es disminuir el uso de dispositivos invasivos, siempre que sea posible.

2.4. Bacterias Gram -

2.4.1 Genero *Escherichia coli*.

Angeles, 2002 Explica que *Escherichia coli* es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*, Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea.

Mosquito & Ruiz, 2011 Afirman que *E. coli* se caracteriza por poseer bacilos Gram negativos, no esporulante, producción de indol a partir de triptófano, no utilización de citrato como fuente de carbono y no producción de acetoina. Además, fermenta la glucosa y la lactosa con producción de gas poseen flagelos móviles, miden 0.5 μ de ancho por 3 μ de largo, catalasa positivos, oxidasa negativos reducen nitratos a nitritos, producen vitamina B y K.

Como todas las bacteria Gram -, la cubierta de *E. coli* consta de tres elementos: la membrana citoplasmática, la membrana externa y, entre ambas, un espacio periplásmico constituido por péptido-glucano. Esta última estructura confiere a la bacteria su forma y rigidez, y le permite resistir presiones osmóticas ambientales relativamente elevadas.

2.4.2. Resistencia de Escherichia coli a los antibióticos.

La resistencia antibiótica es un problema emergente a nivel mundial presente en diversas bacterias, en especial en la *Escherichia coli*, que tiene altos porcentajes de resistencia hacia ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, y ácido nalidíxico, lo que supone grandes complicaciones en el tratamiento antibiótico cuando este es requerido.

Este aumento de resistencia antibiótica se debe a la adquisición de diferentes mecanismos moleculares de resistencia mediante mutaciones puntuales a nivel cromosómico o transferencia horizontal de material genético entre especies relacionadas o diferentes, facilitada por algunos elementos genéticos tales como los integrones.

Betelgeux, 2016 Señala los efectos de los mecanismos moleculares de resistencia más comunes en *E. Coli*: inactivación enzimática, alteraciones en el sitio blanco y alteraciones de la permeabilidad. El conocer los mecanismos de resistencia implicados, como lo recomienda la Organización Mundial de la Salud, permitirá optimizar la vigilancia de resistencia y las políticas de control y uso de antibióticos a nivel nacional.

2.5. Método de difusión agar o método de (kirby y bauer)

Este es un método cualitativo, que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Partiendo de una muestra clínica siempre se debe realizar un cultivo puro para poder comenzar el estudio de la sensibilidad antibiótica.

Para esto se utiliza la técnica de aislamiento en placas que contengan un medio adecuado para la cepa en estudio (al cual además se le deben otorgar las condiciones atmosféricas específicas de esa cepa).

Ferrano.M.J., 2000 Indica que el antibiograma por disco difusión basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores, es uno de los métodos que el NCCLS recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos.

Según **Ferrano, 2001** el método de disco difusión consiste en depositar en la superficie de una placa de agar MH previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se

pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano.

2.6. Espectro de susceptibilidad

Las pruebas de sensibilidad bacteriana se llevan a cabo mediante el antibiograma que sirve para medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos. El estudio de la sensibilidad in vitro es uno de los requisitos previos para la eficacia in vivo de un tratamiento antibiótico.

2.6.1. Sensibilidad.

El resultado sensible significa que hay una alta probabilidad de que el paciente responda al tratamiento con un antibiótico testado.

2.6.2. Resistencia.

El resultado resistente significa que hay una alta probabilidad de que el antibiótico no ejerza efecto farmacológico sobre el microorganismo y haya falla terapéutica.

2.6.3. Sensibilidad intermedia.

Canton & Garcia, 2000 Indican que el resultado intermedio puede tener varios significados. Con agentes que se pueden administrar a altas dosis, puede significar que se deben utilizar altas

dosis de antibióticos para que el tratamiento sea eficaz o que el agente puede ser eficaz si se concentra en el sitio de infección.

2.7 Método de dilución en caldo

La técnica de dilución en caldo es un método cuantitativo que permite determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM).

En el método de dilución en caldo se emplea por cada combinación de microorganismo con antimicrobiano, un juego de tubos. Habitualmente se prepara el juego de tubos con 1ml de caldo Mueller Hinton suplementado con Ca^{++} y Mg^{++} estéril sin antimicrobiano. Para un pequeño número de pruebas se preparan diluciones al doble directamente en los tubos.

Ferrano M. , 2000 Indica que se colocan 2 ml de solución de antibiótico en el primer tubo de la serie de diluciones en cada uno de los tubos restantes se añade 1 ml de caldo Mueller Hinton. Con una pipeta estéril se transfiere 1 ml del primer tubo al segundo.

Después de mezclar el contenido del segundo tubo, se transfiere 1 ml con una pipeta diferente (en esta transferencia y en todas las sucesivas) al tercer tubo.

El proceso continúa hasta el penúltimo tubo, al que se le quita 1 ml, que se descarta. El último tubo no recibe solución de antibiótico y sirve de control de crecimiento bacteriano.

2.7.1 .Concentración inhibitoria mínima.

Se define CIM como la mínima concentración de antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento in vitro de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (concentración conocida de gérmenes).

2.7.2. Concentración bactericida mínima.

Se define como CBM la mínima concentración de un antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte in vitro del 99.9% de una población bacteriana previamente estandarizada.

2.8 Marco conceptual

Miel de abeja: Se entiende por miel la sustancia dulce natural producida por abejas Apis Mellífera a partir del néctar de las plantas, de secreciones de partes vivas de estas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas y que las abejas recogen y transforman y combinan con sustancias específicas propias, y depositan deshidratan, almacena y dejan en el panal para que madure.

Efecto antimicrobiano: Un antimicrobiano es una sustancia que elimina o inhibe el crecimiento de los microorganismos, tales como: Bacterias, hongos y parásitos.

Efecto Bacteriostático: Un efecto bacteriostático es aquel que aunque no produce la muerte a una bacteria, impide su reproducción; la bacteria envejece y muere sin dejar descendencia.

Efecto bactericida: Un efecto bactericida es aquel que produce la muerte a una bacteria y este es provocado por alguna sustancia bactericida.

Bacteria Gram negativa: Se denomina bacterias gram negativas a aquellas que no se tiñen de color azul o de violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue de ahí el nombre de Gram negativas.

Bacteria Gram positiva: Se le denomina bacterias Gram positivas, o bacterias Gram positivas, a aquellas que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de gram.

Inhibina: En la naturaleza, la Inhibina también es utilizada por las abejas y forma parte de la composición de la miel en la que tiene un papel antibacteriano.

Halo de Inhibición: Es la zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen.

Antibiograma: Es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad de una bacteria a un grupo de antibióticos.

Difusión Agar o método de Kirby y Bauer: Este es un método cualitativo que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable, este método consiste en depositar en la placa de agar Mueller Hinton previamente inoculada discos de papel filtro impregnados de diferentes concentraciones de antibióticos.

Método de dilución en caldo: La técnica de dilución en caldo se caracteriza por ser un método cuantitativo que permite determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) y la concentración mínima bactericida (CBM).

CIM: Es la concentración más baja de antibiótico que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación.

CBM: Es la mínima cantidad de antibiótico capaz de destruir el 99,9 % de una muestra inoculada en condiciones estandarizadas.

Escala de Duraffourd: Escala utilizada para determinar cualitativamente el efecto inhibitorio *in vitro*, según diámetro de inhibición.

Clasificación según el halo de inhibición.

- Nula (-): para un diámetro inferior a 8 mm.
- Sensibilidad al límite (sensible = +): para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.
- Medio (muy sensible = ++): para un diámetro entre 14 y 20 mm.
- Sumamente sensible (+++): para un diámetro superior a 20 mm.

2.9. Marco legal.

2.9.1. Definición (NCCLS).

El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), anteriormente conocido como “El Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS),” es una organización sin fines de lucro con miembros que representan múltiples disciplinas. Su misión es promover el desarrollo y el uso voluntario de estándares y guías consensuados de laboratorio.

En el caso de que se realicen ensayos de sensibilidad a los antibióticos (opcional), se utilizará un método de ensayo validado y controlado, como los recomendados por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, desde el 1 de enero de 2005: «Clinical and Laboratory Standards Institute» - CLSI.

Todos los métodos de estudio aquí utilizados están estandarizados por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), de manera que los resultados sean reproducibles y comparables.

La realización de estos procedimientos requiere la utilización de cepas de control de calidad con resultados conocidos, de manera de saber si nuestra metodología se realizó en forma correcta. Dentro de los parámetros a estandarizar se encuentran los siguientes:

a) El tipo de bacterias a estudiar, ya que no es lo mismo un microorganismo de crecimiento rápido que lento, exigente o no exigente, aerobio o anaerobio.

b) Los medios de cultivo para realizar las pruebas. De los medios disponibles se considera que tanto el agar como el caldo Mueller Hinton (MH) son los más apropiados para las pruebas de sensibilidad de rutina dado que muestran buena reproducibilidad entre los diferentes lotes comerciales, son baratos, contienen bajo nivel de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprim y tetraciclinas, son adecuados para la mayoría de las bacterias patógenas en lo que a requerimientos nutricionales se refiere y existen suficientes datos recopilados que avalan su uso en las pruebas de sensibilidad.

A pesar de estas cualidades, algunos parámetros del medio se deben controlar en cada lote de uso, como ser:

pH: para cada lote debe ser controlado cuando se prepara el medio. El agar debe tener un pH 7,2-7,4 a temperatura ambiente.

Si el pH es demasiado bajo ciertas drogas como amino glucósidos, quinolonas y macrólidos parecerán menos activas, mientras otras como las tetraciclinas parecerán tener mayor actividad. Si el pH es más alto se podrán esperar los resultados opuestos.

Humedad: si existe un exceso de humedad en la superficie del agar las placas deben ser incubadas a 35°C durante 10 a 30 minutos antes de utilizarse. Las placas deberán estar húmedas pero no mostrar gotas de agua en la superficie.

Efecto de la timina o timidina: los medios que contienen un exceso de timina o timidina pueden revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y trimetoprim, produciendo alteraciones en las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano en la placa.

El medio debe ser preparado según las indicaciones del fabricante. Luego de preparado debe esterilizarse y cuando llega a una temperatura aproximada de 50° C debe ser repartido en las placas de Petri. El espesor del mismo debe oscilar entre 3 y 5 mm. Para esto se considera que aquellas placas de 150 mm de diámetro deben llevar 60 a 70 ml del medio, y las que tienen 100 mm de diámetro deben llevar 25 a 30 ml.

Las placas que no se usan en el día pueden mantenerse en el refrigerador; aquellas con más de siete días de preparación no son adecuadas, salvo que sean envueltas en bolsas de plástico para evitar la desecación, de lo contrario deben controlarse con los organismos de referencia.

Se debe controlar la esterilidad de cada lote incubando al menos una de sus placas 24 horas o más a 35°C, si hay o no crecimiento de algún microorganismo contaminante.

c) El tiempo de incubación: la mayoría de los resultados deben leerse entre 18 y 20 horas, aunque para la lectura de la meticilinorresistencia en *S. aureus* debe incubarse 24 horas completas.

d) La temperatura de incubación, lo cual altera la velocidad de crecimiento bacteriano y su viabilidad.

e) El estado de los antibióticos, su fecha de vencimiento si se trata de discos, o su potencia si se trata de antibiótico como droga.

Si bien estos parámetros pueden ser controlados físicamente, es decir el operario puede controlar temperaturas, tiempos, estados de los medios, etc., los controles de calidad se realizan utilizando cepas conocidas.

2.9.2 Macro dilución en caldo.

Las pruebas de dilución han sido utilizadas durante años. Los procedimientos iniciales eran realizados en tubos de ensayo grandes (13 por 100 mm) con volúmenes de caldo de por lo menos 1 ml. Este método fue estandarizado en la década de los años 70 por el Estudio Cooperativo Internacional y luego la NCCLS publicó un estándar del método. Este método es llamado macrodilución en caldo. A partir de los años 60 se comenzaron a utilizar dispositivos serológicos para dispensar y diluir. Esta miniaturización simple de la técnica se conoció como micro dilución en caldo.

El caldo Mueller Hinton cumple con los requerimientos de la Organización Mundial de la Salud y está especificado en la FDA. Este medio es el seleccionado por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) para realizar las pruebas de susceptibilidad, por su alta reproducibilidad, su bajo contenido de sustancias inhibitoras y el crecimiento satisfactorio que presentan la mayoría de los patógenos no fastidiosos.

Con este medio se han llevado a cabo una gran cantidad de estudios sobre susceptibilidad antimicrobiana.

2.9.3 Método de disco difusión.

El antibiograma por disco difusión basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores, es uno de los métodos que el NCCLS recomienda para la de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos.

Indicaciones: el antibiograma está indicado en las siguientes situaciones:

- Se aísla una bacteria responsable de un proceso infeccioso y no puede predecirse su sensibilidad, especialmente si se sabe que este tipo de bacteria puede presentar resistencia a los antimicrobianos más habituales.
- En estudios epidemiológicos, aunque hasta el momento no se halla descrito mecanismos de resistencia para dicho organismo.
- Cuando a pesar de conocerse la sensibilidad del germen a drogas altamente efectivas, el paciente no puede recibir dicha medicación (sensibilidad de *S. pyogenes* a eritromicina en pacientes alérgicos a la penicilina).
- En el estudio de nuevos antibióticos.

2.9.4 Cepas de referencia utilizadas en pruebas de susceptibilidad.

Las cepas de referencia en métodos de dilución aconsejadas por el NCCLS son:

Staphylococcus aureus ATCC 29213: Control para antimicrobianos usados frente a bacterias Gram positivas.

Enterococcus faecalis ATCC 29212: Control para antimicrobianos usados frente a bacterias Gram positivas, y para control de trimetoprim/sulfametoxazol.

Escherichia coli ATCC 25922: Control de antimicrobianos usados frente a bacterias gramnegativas.

Escherichia coli ATCC 35218: Control para las combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas.

2.9.5 Hipótesis o preguntas directrices.

La miel de las abejas *Apis Mellífera* posee efecto antibacteriano sobre las bacterias Gram + *Staphylococcus aureus. ATCC 25923* y *Enterococcus faecalis ATCC 11700* y en Gram - *Escherichia coli ATCC 25922*.

CAPÍTULO III

3.1. Diseño metodológico/ Marco metodológico

3.1.1. Descripción del ámbito de estudio.

El estudio se lleva a cabo en el laboratorio de docencia del departamento de Bioanálisis clínico IPS ubicado en la UNAN-MANAGUA, en el recinto universitario Rubén Darío (RURD).

3.1.2. Tipo de estudio (según el o los métodos).

El estudio realizado es de tipo experimental porque, se controla la acción de una variable sobre otra y analítico ya que permite experimentar el efecto antibacteriano de la miel de abejas *Apis Mellifera* ante las cepas bacterianas en estudio.

3.1.3. Población y muestra.

3.1.3.1. Población.

Miel producida por las abejas *Apis Mellífera* en la ermita localizada en la comunidad valle de la laguna de apoyo del departamento de Masaya durante los meses de agosto-Diciembre del año 2018.

3.1.3.2. Muestra.

Se tomó como muestra 1000 ml de miel de abejas *Apis mellífera*, recolectada en la ermita localizada en la comunidad valle de la laguna de apoyo del departamento de Masaya.

3.1.3.3 Criterios de inclusión

Miel recolectada solo en la ermita localizada en la comunidad valle de la laguna de apoyo del departamento de Masaya.

Miel 100% pura.

Miel de abejas *Apis mellífera* exenta de partículas.

Miel producida solo por la abeja *Apis Mellífera*.

3.1.3.4 Criterios de exclusión.

Miel que sea recolectada en otros municipios del departamento de Masaya.

Miel impura.

Miel que presente partículas extrañas.

Miel que sea de otra especie de abeja.

3.1.4. Variables y Operacionalización.

3.1.4.1. Variable independiente.

Miel de abeja *Apis mellifera*.

3.1.4.2. Variables dependientes.

- Efecto antibacteriano de la miel de abeja *Apis mellifera* sobre las cepas bacterianas.
- CIM
- CBM
- Efecto antibacteriano de la miel sobre las cepas bacterianas.

3.1.4.3. Operacionalización de las variables.

Tabla 1. Operacionalización de las variables.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Tipo de variable		Escala
				Según su naturaleza	Según su función	
Variable independiente Miel de abejas (<i>Apis Mellífera</i>)	La miel es una sustancia dulce natural producida por las abejas a partir del néctar de las flores, de la secreción de partes vivas de las plantas.	Se medirá según la designación de la concentración utilizada	Concentración Pura 1,000 mg/ml 500 mg/ml 250 mg/ml 125 mg/ml	Cuantitativa	Independiente	De Razón

<p>Variable dependiente</p> <p>Efecto antibacteriano de la miel sobre las cepas bacterianas.</p>	<p>Capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano debido a la presencia de la miel de abeja.</p>	<p>Presencia y tamaño</p>	<p>Medición de halos de inhibición expresada en (mm)</p>	<p>Cualitativa</p>	<p>Dependiente</p>	<p>Duraffourd</p>
--	--	---------------------------	--	--------------------	--------------------	-------------------

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Tipo de variable		Escala
				Según su naturaleza	Según su función	
Concentración inhibitoria mínima (CIM).	Se define CIM como la mínima concentración de antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento de un inóculo bacteriano.	Grado de turbidez.	µg/ml o mg/ml	Cuantitativa	Dependiente	Control de miel Control de inóculo Control de caldo
Concentración bactericida mínima (CBM).	Se define como CBM la mínima concentración de un antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte in vitro del 99.9% de una población bacteriana.	Grado de turbidez.	µg/ml o mg/ml	Cuantitativa	Dependiente	Control de miel Control de inóculo Control de caldo

Fuente: Propia.

3.1.4.4 .Material y método.

Tabla 2. Material y método

Materiales para realizar el estudio de sensibilidad, C.I.M y C.B.M.		
Cristalería	Equipos e instrumentos	Medios y Reactivos
Platos Petri	Mecheros bunsen	Caldo Müeller-Hinton
Pipetas 1ml	Pipetas automáticas	Agar Mc Conkey
Tubos de ensayo estériles	Incubadora	Agar sangre
Beaker de 100 ml	Aplicadores estériles	Agar Mueller-Hinton en placas
Probetas de 100 ml	Asa de punta redonda	Miel
Asas Grigalski.	Gradillas	sensidiscos
Platos Petri estériles.	Pinzas estériles	Alcohol 97%

Materiales para realizar el estudio de sensibilidad, C.I.M y C.B.M.		
Cristalería	Equipos e instrumentos	Medios y Reactivos
Platos Petri	Incubadora.	Cloro
Erlenmeyer	Balanza Digital.	Escala Mc.farland 0.5 %
	Vortex.	Agua peptonada 0.1%
	Mecheros.	Agua destilada

Fuente: Propia

3.2 Método

Preparación de medios de cultivos

Método para preparar agar Mueller - Hinton:

Preparación:

Se suspende 38 g del medio en un litro de agua purificada y luego se calienta con agitación suave hasta su completa disolución y dejar ebulir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y vaciar en placas de Petri estériles.

3.2.1 Método para preparar agar sangre.

Preparación:

El agar sangre es una combinación de agar base, generalmente agar nutritivo, y sangre. Se puede utilizar sangre de oveja, de otros animales e incluso humana.

Al preparar agar sangre se sigue el mismo procedimiento que se realiza al preparar agar Mueller Hinton y además se le agrega 3.5% de sangre humana.

Es un medio rico que aporta muchos factores de crecimiento para microorganismos exigentes. Se utiliza también para ver la capacidad hemolítica de los microorganismos patógenos, por lo que se considera un medio diferencial.

3.2.2 Método para preparar agar Mac Conkey.

Se rehidratan 50 g del medio en un litro de agua destilada luego se deja Reposar de 10 a 15 minutos. Seguidamente Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo, para luego Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en cajas de Petri estériles agregar 13.5 ml aproximadamente para obtener 5 mm de altura. Luego se deberá Conservar en refrigeración de 2 a 8°C y el pH del medio debe estar entre 7.1 ± 0.2

3.2.3 Recuperación de bacterias.

Las bacterias fueron reactivadas y conservadas de la siguiente manera: Manteniendo las bacterias en agar leche y haciendo pases periódicos de placa a placa, congelando las cepas en leche descremada estéril al 0,1%.

3.2.4. Realización de siembra. (Inoculación).

- Marcar el material con el nombre del grupo.
- Realizar la siembra a como sigue:
- Siembra en placas: Divida la placa en tres partes sembrando en cada tercio del inóculo tomado de los cultivos crecidos.

Se introduce el Asa de siembra en el tubo con cultivos crecidos y se toma una gota del inóculo que se extiende sobre la placa de agar deslizando el Asa en forma de Zigzag.

3.2.5 Incubación.

Se procederá a incubar todos los platos Petri previamente inoculados a 37° C hasta que haya crecimiento bacteriano

3.2.6. Observación de pureza de cultivos.

Observar si hay colonias de bacterias de coloración diferente a las de estudio.

Viabilidad, recuperación de bacterias.

3.2.7 Preparación de las diluciones de la miel.

Se procede de la siguiente manera:

Se pesaron 10 g de miel en una balanza digital para luego agregarla a un Erlenmeyer de 100 ml y se procedió a diluir la miel hasta el punto de aforo. Luego se procedió a realizar los cálculos necesarios para obtener alícuotas de esta dilución madre para concentraciones (10,000 mg/100ml, 500mg/5ml, 250mg/2.5ml, 125mg/1,25ml) y miel pura.

3.3. Cálculos

Calculo de la concentración a partir de 5 gramos de miel en 100 ml para sensidiscos.

5000 mg el 100 ml (Solución madre).

$$1 \text{ g} \text{ --- } 1,000 \text{ mg} \qquad 5 \text{ g} \times \frac{1,000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} = 5,000 \text{ mg en } 100 \text{ ml}$$

$$5 \text{ g} \text{ --- } x$$

Preparación de alícuotas

$$5,000 \text{ mg} \text{ --- } 100 \text{ ml} \qquad 1,000 \text{ mg} \times \frac{100 \text{ ml}}{5,000 \text{ mg}} = 20 \text{ ml} \left(\frac{1,000 \text{ mg}}{20 \text{ ml}} \right) [1]$$

$$1,000 \text{ mg} \text{ --- } x$$

1,000 mg de miel de abeja están contenidos en 20 ml de agua

$$5,000 \text{ mg} \text{ --- } 100 \text{ ml} \qquad 500 \text{ mg} \times \frac{100 \text{ ml}}{5,000 \text{ mg}} = 10 \text{ ml} \left(\frac{500 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \right) [2]$$

$$500 \text{ mg} \text{ --- } x$$

500 mg de miel de abeja están contenidos en 10 ml de agua.

$$5,000 \text{ mg} \text{ --- } 100 \text{ ml} \qquad 250 \text{ mg} \times \frac{10 \text{ ml}}{500 \text{ mg}} = 5 \text{ ml} \left(\frac{250 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \right) [3]$$

$$250 \text{ mg} \text{ --- } x$$

250 mg de miel de abeja están contenidos en 5 ml de agua.

5,000mg - - - -100 ml

$$125mg \times \frac{10 \text{ ml}}{500mg} = 2.5ml \left(\frac{125mg}{2.5ml} \right) [4]$$

125 mg - - - -x

Miel pura sin diluir [5]

Calculo de la concentración a partir de 10 gramos de miel en 100 ml para sensidiscos.

Solución madre:

Para preparar la solución madre se agregan en una probeta 10,000 mg de miel previamente pesada en gramos para luego diluir y aforar hasta 100 ml de agua.

1 g - - - -1,000 mg

$$10g \times \frac{1,000mg}{1g} = 10,000 \text{ mg en } 100 \text{ ml}$$

10 g - - - -x

10,000 mg de miel de abeja están contenidos en 100 ml de agua.

10,000 mg - - - -100 ml

$$1,000mg \times \frac{100ml}{10,000mg} = 10 \text{ ml} \left(\frac{1,000 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \right) [1]$$

1,000 mg - - - -x

1,000 mg de miel de abeja están contenidos en 10 ml de agua.

10,000 mg - - - -100 ml

$$500mg \times \frac{100ml}{10,000 \text{ mg}} = 5 \text{ ml} \left(\frac{500 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \right) [2]$$

500 mg - - - -x

500 mg de miel de abeja están contenidos en 5 ml de agua.

$$10,000 \text{ mg} \text{ --- } 100 \text{ ml} \qquad 250 \text{ mg} \times \frac{100 \text{ ml}}{10,000 \text{ mg}} = 2.5 \text{ ml} \left(\frac{250 \text{ mg}}{2.5 \text{ ml}} \right) [3]$$

$$250 \text{ mg} \text{ --- } x$$

250 mg de miel de abeja están contenidos en 2.5 ml de agua

$$10,000 \text{ mg} \text{ --- } 100 \text{ ml} \qquad 125 \text{ mg} \times \frac{100 \text{ ml}}{10,000 \text{ mg}} = 1.25 \text{ ml} \left(\frac{125 \text{ mg}}{1.25 \text{ ml}} \right) [4]$$

$$125 \text{ mg} \text{ --- } x$$

125 mg de miel de abeja están contenidos en 1.25 ml de agua

Miel pura sin diluir [5]

3.4 Método de disco difusión (método de Kirby y Bauer)

Procedimiento para el ensayo número 1 y 2.

Se pesaron 5 gr de miel de la muestra, se diluye con agua destilada estéril y se afora en una probeta de 100ml.

Anteriormente obtenidos los cálculos para 5 y 10 gramos de miel pesados en una balanza digital en busca de las concentraciones para 5 gramos previamente pasados a mg con el objetivo de que las concentraciones queden como si fuera un antibiótico. (1,000 mg/20 ml) (500 mg/10ml), (250mg/5ml), (125 mg/2.5 ml), y miel pura, concentraciones para 10 gramos

(1000 mg/10 ml), (500mg/5ml), (250mg/2.5ml), (125mg/1.5ml), y miel Pura, estas 5 concentraciones serán utilizadas para impregnar los sensidiscos.

Una vez preparadas las concentraciones se procede a impregnar los sensidiscos con cada una de las concentraciones por separado en platos Petri; se rotulan con las concentraciones correspondientes y luego se dejan reposar durante diez minutos con la finalidad de que la miel sea absorbida por los sensidiscos.

Luego se procedió a preparar el inóculo de las tres bacterias en estudio *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, y *Enterococcus faecalis* ATCC 11700 y Gram - *Escherichia coli* ATCC 25922, estos se preparan de la siguiente manera, se colocan tres tubos rotulados con el nombre y código de cada bacteria en una gradilla, estos a su vez contienen 3 ml de solución salina luego partiendo de un cultivo puro con un aza punta redonda previamente esterilizada con la llama de color amarillo del mechero bunsen se toma dos colonias de cada plato que contiene cada una de las bacterias y se introduce el aza en la solución salina de cada tubo, para luego dispersar las colonias agitando suavemente y así homogenizar la suspensión la turbidez del inóculo debe equivaler al 0,5 de la escala de Mc Farland.

Una vez pasados los diez minutos de reposo de los sensidiscos impregnados con miel se procede a hacer el rayado o siembra de las bacterias con un hisopo de algodón, antes de introducir el hisopo al inóculo de cada bacteria se abre cuidadosamente el tubo que contiene el inóculo y la boca del tubo se flamea con el mechero de bunsen para evitar contaminación.

Luego de flamear se introduce el hisopo en el inóculo y se retira el exceso de inóculo para evitar que el hisopo vaya muy cargado.

Se procede a inocular la superficie de las placas de agar Mueller Hinton con el hisopo o aplicador pasándolo uniformemente por toda la superficie en tres direcciones, por último pasar el hisopo por el reborde de la placa de agar, inoculando cuatro platos por cada bacteria equivalentes a 4 repeticiones.

Luego de hacer el rallado se procede a rotular los platos con las cinco concentraciones con una posición de acuerdo a las manecillas del reloj de manera que quede ordenada de la mayor concentración hasta la menor concentración y el sensidisco de miel pura se coloca en el centro.

Luego se procede a colocar los cinco sensidiscos impregnados con concentraciones diferentes y estos son colocados con una pinza esterilizada y apretándolos suavemente sobre la superficie del agar, estos discos no deben estar a menos de 15 mm de los bordes de la placa y lo bastante separado para que no se superpongan sus zonas de inhibición el sensidisco control en este caso el cloranfenicol se coloca en un espacio en el cual este no haga contacto con los demás sensidiscos para poder apreciar una mejor formación de halos, una vez colocados los sensidiscos se tapan los platos y se dejan reposar por 10 minutos y luego se incuban las placas en posición invertida a 37 °C durante 18 – 24 horas.

Una vez cumplidas las 24 horas se extraen los platos de la incubadora para medir los diámetros de los halos de inhibición con una regla milimetrada.

3.5 Método de dilución en caldo

Se pesaron 10 g de miel pura en un Beaker de 50 ml luego se agregaron 30 ml de agua destilada para disolver la miel pura y homogenizar; una vez homogenizada se traspara a una probeta de 100 ml estéril y con agua peptonada (H₂O PP), al 0.1% se afora a 100 ml.

Luego se pasa a un Erlenmeyer estéril y se le coloca una tapa elaborada con papel aluminio para evitar contaminación de la muestra.

En una gradilla se marcaron 3 series de tubos con boca y tapa de rosca diferentes por cada bacteria respectivamente rotulados con el nombre y código de cada una, además estos tubos están enumerados del 1 al 11 y contienen 1 ml de agua peptonada al 0.1%. Para luego tomar 1ml de miel diluida con agua peptonada para agregarse al primer tubo de cada serie de tubos.

Se procede a traspasar 1 ml del tubo número 1 de cada serie al tubo número dos y así sucesivamente hasta llegar al tubo número 8 al cual se le descarta 1 ml.

Al tubo número 9 se le agrega 1ml de caldo.

Al tubo número 10 se le agrega 1 ml de inculo.

Al tubo número 11 se le agrega 1ml de miel.

El tubo número 9 servirá de control de caldo, el tubo número 10 servirá de control de inóculo y el tubo número 11 servirá de control de miel, a cada serie de tubos se agrega 1 ml de inóculo del tubo número 1 al 8.

Seguidamente se somete a incubación durante 24 horas a 37°C.

Pasadas las 24 horas se procede a la lectura e interpretación de la prueba de la CIM.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y de la concentración bactericida mínima (CBM).

3.5.1. Evaluación del Efecto Antibacteriano

La evaluación se realizó cuantitativamente y por medición numérica de los halos de inhibición, y cualitativamente tomando como referencia las pautas por Duraffourd (Duraffourd, 1987).

En la CIM (Concentración mínima inhibitoria) se evaluó el grado de turbidez obteniéndose efecto mínimo inhibitorio a una dilución del 75% de miel y 25 ml de agua en el tubo número 8.

3.5.2. Escala de Duraffourd:

Escala utilizada para determinar cualitativamente el efecto inhibitorio in vitro, según diámetro de inhibición.

- Nula (-): para un diámetro inferior a 8 mm.
- Sensibilidad límite (sensible = +): para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.

- Medio (muy sensible = ++): para un diámetro entre 14 y 20 mm.
- Sumamente sensible (+++): para un diámetro superior a 20 mm.

3.6 Materiales para recolectar la información

- Bibliografías sobre estudios de miel de abeja
- Páginas web.
- Archivos de revista.
- Tesis.
- Se elaboraron fichas de recolección de datos de laboratorio.

3.6.1. Materiales para procesar la información.

- Microsoft Word.
- Excel 2013

3.6.2. Método o métodos a utilizar (según el tipo de estudio).

Método mixto (se realizara el estudio por medio de métodos cuantitativos y cualitativos).

El tipo de estudio es experimental, debido a que se elabora una hipótesis y se diseña el experimento con el fin de reproducir el objeto de estudio, controlando el fenómeno para probar la validez de la hipótesis.

CAPÍTULO IV

4.1 Análisis de los resultados

El presente trabajo tuvo como objetivo principal evaluar el efecto antibacteriano de la miel de abejas *Apis mellifera* en microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Donde se obtuvieron los siguientes resultados.

De acuerdo al método de Kirby Bauer se midieron los tamaños del halo de inhibición de los sensibilizados a diferentes concentraciones de la miel frente a las cepas bacterianas ensayadas; cabe mencionar que estos resultados son el promedio de cuatro repeticiones por cada concentración:

1- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923:

Pura: 15 mm

1000 mg/ml: 12.5 mm

500 mg/ml: 11.75 mm

250 mg/ml: 11.5 mm

125 mg/ml: 11 mm

Como es posible de observar, la miel es mayormente efectiva en concentración pura y a medida que disminuye en las diluciones su efectividad de igual manera lo hace. Según la escala Duraffourd mediciones que se encuentren entre 14- 20 mm indica de que una bacteria es muy sensible y las medidas que van de 8-14 mm indican que la bacteria es sensible, por lo tanto *Staphylococcus aureus* frente a la miel en concentración pura es muy sensible y en todas las concentraciones inferiores comprendidas en este estudio es sensible.

2- *Enterococcus faecalis* ATCC 11700

Pura: 13.5 mm

1000 mg/ml: 11.7 mm

500 mg/ml: 9.5 mm

250 mg/ml: 8.7mm

125 mg/ml: 7.33 mm

Respecto a los resultados de *Staphylococcus aureus* la efectividad de la miel en *Enterococcus faecalis* se ve reducida, siendo efectiva hasta una concentración de 250 mg/ml según la escala Duraffourd debido a que las medidas comprendidas entre 8 a 14 mm indica que la bacteria es sensible; sin embargo a una concentración de 125 mg/ml la efectividad de la miel es nula según la escala Duraffourd que indica que mediciones inferiores a 8mm de tamaño de halo de inhibición el efecto de la miel es nulo y por lo tanto la bacteria es resistente.

3- *Escherichia coli* ATCC 25922

Pura: 12 mm.

1000 mg/ml: 0 mm

500 mg/ml: 0 mm

250 mg/ml: 0 mm

125 mg/ml: 0 mm

Staphylococcus aureus. ATCC 25923 y Enterococcus faecalis y en Gram - Escherichia coli.

A diferencia de los resultados anteriores en *Escherichia coli* la miel solo presento efectividad inhibitoria pura con un diámetro de halo de 12mm, no así en las diluciones donde no se observó halo de inhibición.

Se pudo observar que en la bacterias **Gram + *Staphylococcus aureus ATCC 25923*** y ***Enterococcus faecalis ATCC 11700***, la miel de abeja *Apis mellifera* posee mayor efecto inhibitorio en casi todas las concentraciones, mientras que en la **Gram - *Escherichia coli ATCC 25922*** no se observó inhibición bacteriana en ninguna concentración; sin embargo hubo presencia de halo de inhibición en miel pura, debido a la características morfológicas de cada bacteria. Por lo tanto se evidencia que a mayor concentración mayor efecto inhibitorio.

En lo referente a la concentración mínima inhibitoria mínima se pudo observar que solo hubo efecto inhibitorio en ***Staphylococcus aureus ATCC 25923*** a una concentración de 75 mg, no así en las bacterias ***Enterococcus faecalis ATCC 11700***, y ***Escherichia coli ATCC 25922***, en las cuales no se evidencio disminución del grado de turbidez según la escala de Mc.farland. Sin embargo no hubo efecto bactericida en ninguna de los tres tipos de bacteria.

Se logró evidenciar que el efecto difiere según la especie bacteriana utilizada habiendo efecto inhibitorio mayor sobre las cepas gram + ***Staphylococcus aureus ATCC 25923*** (ver

anexo tabla 3) y *Enterococcus faecalis* ATCC 11700 (Ver anexo tabla 4), que sobre la cepa Gram - de *Escherichia coli* ATCC 25922,(Ver anexo tabla 5) esto se puede justificar por la estructura particular de ambas bacterias, es decir la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 11700 posee una pared celular rica en peptidoglucano, a través de la cual la miel se difunde con mayor facilidad, mientras que *Escherichia coli* posee una pared celular con membrana externa rica en fosfolípidos y en polisacáridos lo que le confiere mayor hidrofobicidad y dificultad de emulsión respectivamente (Ver anexo ilustración 2).

Esto quiere decir que sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 solo hubo efecto inhibitorio a concentración pura y no en diluciones lo cual se evidencia en los resultados obtenidos en este estudio, ya que se logró visualizar halo de inhibición en las placas Petri solamente en pura y en las concentraciones 1,000 mg/ml, 500 mg/ml, 250 mg/ml y 125 mg/ml no hubo ningún efecto inhibitorio es decir no se observó halo de inhibición (Ver anexo foto 11).

Este posee concordancia con los resultados de **Aguilera, 2009**, que con respecto a *Staphylococcus aureus* *reporta* que todas las cepas de *Staphylococcus aureus* utilizadas en su estudio fueron inhibidas, mientras que las de *Escherichia coli* resultaron ser resistentes; sin embargo a diferencia de los resultados obtenidos en este estudio se evidencio que solo hubo halo de inhibición en miel pura con halo de inhibición promedio de 12mm y no en las diluciones.

La evidencia encontrada en el presente estudio, nos demuestra que la miel de abeja a mayor concentración produce un mayor efecto antibacteriano que provoca el efecto inhibitorio de estas bacterias, resultados concordantes con los de **Aguilera, 2009**.

Además es importante tomar en cuenta el origen floral de la miel, así mismo como la estación en la que las abejas recolectan el polen para su elaboración ya que de esto y además de otros factores como el almacenamiento debido a la foto sensibilidad de la miel, tiempo de maduración de la miel, pH, Contenido de agua u Osmolaridad entre otros depende el efecto antibacteriano de la miel.

Referente a la técnica de dilución en caldo se obtuvieron resultados en los cuales se obtuvo una concentración mínima inhibitoria para *Staphylococcus aureus* a una concentración de 75 mg/ml, (Ver anexo foto 12) no obstante no se observó efecto bactericida para *Staphylococcus aureus*, sin embargo no se observó concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida en las cepas bacteriana *Enterococcus faecalis ATCC 11700* y *Escherichia coli ATCC 25922*.

CAPITULO V

5.1 Conclusiones

- En conclusión al evaluar la miel de abeja *Apis mellifera*, se evidenció que posee mayor efecto antibacteriano sobre los microorganismos Gram positivos que sobre los Gram negativos demostrando mayor susceptibilidad a la miel de abejas *Apis mellifera* la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus*.
- Se logró identificar la susceptibilidad de los microorganismos Gram + ,frente la miel abeja *Apis mellifera*, Especialmente el *Staphylococcus aureus*
- Se pudo determinar el efecto inhibitorio para *Staphylococcus aureus ATCC 25923* con un valor del 75% (75 mg/ml) de miel siendo esta la concentración mínima inhibitoria (CIM), No así para las cepas bacterianas *Enterococcus faecalis ATCC 11700* y *Escherichia coli ATCC 25922* donde no hubo efecto inhibitorio (CIM).
- El efecto bactericida o (CBM) para los tres cepas bacterianas Gram + *Staphylococcus aureus ATCC 25923* y *Enterococcus faecalis ATCC 11700* y Gram - *Escherichia Coli ATCC 25922* fue nulo.

5.2 Recomendaciones

- Promocionar el consumo de miel de abeja *Apis mellifera* pura en la población habiéndose demostrado el efecto inhibitorio que posee, para disminuir las diferentes afecciones provocadas por *Staphylococcus Aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*.
- Realizar estudios de seguimiento sobre el efecto antibacteriano de la miel de abeja *Apis mellifera* sobre el *Staphylococcus Aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli* in vivo.
- Se recomienda realizar estudios comparativos con mieles de diversas zonas geográficas de nuestro país.

5.3 Bibliografía

Acosta, S. (19 de diciembre de 2005). *Grupo asesor control de infecciones y epidemiología*.

Recuperado el 22 de octubre de 2018, de

<http://www.codeinep.com.ar/control/Enterococcus.pdf>

Aguilera, G. (2009). Evaluación de la actividad antibacteriana de mieles de *Apis mellifera*, contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. *Revista instituto nacional de higiene "Rafael Rangel"*, 1(40), 5-21.

Albert, p. B. (2009). infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. España: ICG
marge.pp.250.

Angeles, G. R. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. México: Rodríguez-Angeles G. Obtenido de
<http://www.insp.mx/salud/index.html>

Barrow GI, F. R. (2010). *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*.
Cambridge: Revista cubana de higiene y epidemiología.

Bautista, R. (2011). Efecto antibacteriano de la miel de abeja en diferentes concentraciones sobre el *Streptococcus mutans*. Lima-Perú: Universidad San Martín de Porres.

Becerra, D., Cabrera, J., & Solano, M. (2016). Efecto antibacteriano de la miel e abeja en sus diferentes concentraciones frente al *Staphylococcus aureus*. *Revista científica Cienc.med*, 2(19), 37-42.

Betelgeux. (19 de enero de 2016). *Escherichia coli Características Patogenicidad y prevención*. Recuperado el 22 de 10 de 2018, de <http://www.Betelgeux.es/block2016/01/19/Escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-j/>

Canton, R., & Garcia. (2000). *Procedimientos en microbiología clínica. métodos básicos para el estudio a la sensibilidad a los antimicrobianos en recomendaciones de la sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Recuperado el 23 de 10 de 2018, de <http://www.seimc.org>

Castillo, D. H. (5 de febrero de 2015). Uso de la miel no procesada para la curación de úlceras por presión. *Uso de la miel no procesada para la curación de úlceras por presión*. Managua, Nicaragua.

Duraffourd, C. (1987). *Cuadernos de fititerapia clínica 4th ed*. Barcelona: Masson.

Echevarria Zarate, J. I. (2003). Estafilococo Meticilino resistente un problema actual en la emergencia entre los gram positivos. *Rev Med Hered, Lima*, 14(4),

<http://www.scielo.org.pe/sciel.php?script=sci_arttxt&pid=s1018-130x2003000400008&lng=es&nrm=iso>.

- Fariñas, M., & Torres, C. (2007). *Enfermedad infecciosa microbiología clínica. enterococo. un patógeno emergente en nuestros hospitales*. Cuba: revista cubana.
- Ferrano, M. (2000). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard* (Vol. 20). España: Publicaciones El mundo.
- Ferrano, M. (2001). *Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing; Eleventh Informational supplement*. (Vol. 21). España: Publicaciones El mundo.
- Ferrano, M.J. (2000). Performance standards for antimicrobial disks susceptibility tests. *Temas de virología y bacteriología médica*, 20(1).
- Jurgina, T. (2003). *Abejas: un mundo extraordinario*. España: UNALM.
- Mosquito, & Ruiz. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociada a diarreas. *Revista Peruana de medicina exp salud pública*, 4(648-56), 28.
- Pasco, G., & Sanchez, F. (2010). Efecto antibacteriano in vitro de miel de abejas *Apis mellifera* en cepas de *Streptococcus mutans*. Lima -Peru: Universidad nacional de Trujillo.
- Perez, Q. (2008). *Susceptibilidad antimicrobiana y factores de virulencia en especies de Enterococcus causante de infecciones pediátricas en Cuba*. *Rev Cubana Med Trop*.

Recuperado el 19 de Diciembre de 2008, de <http://>

SciELO.Sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0375-07602008000200004&ing=es

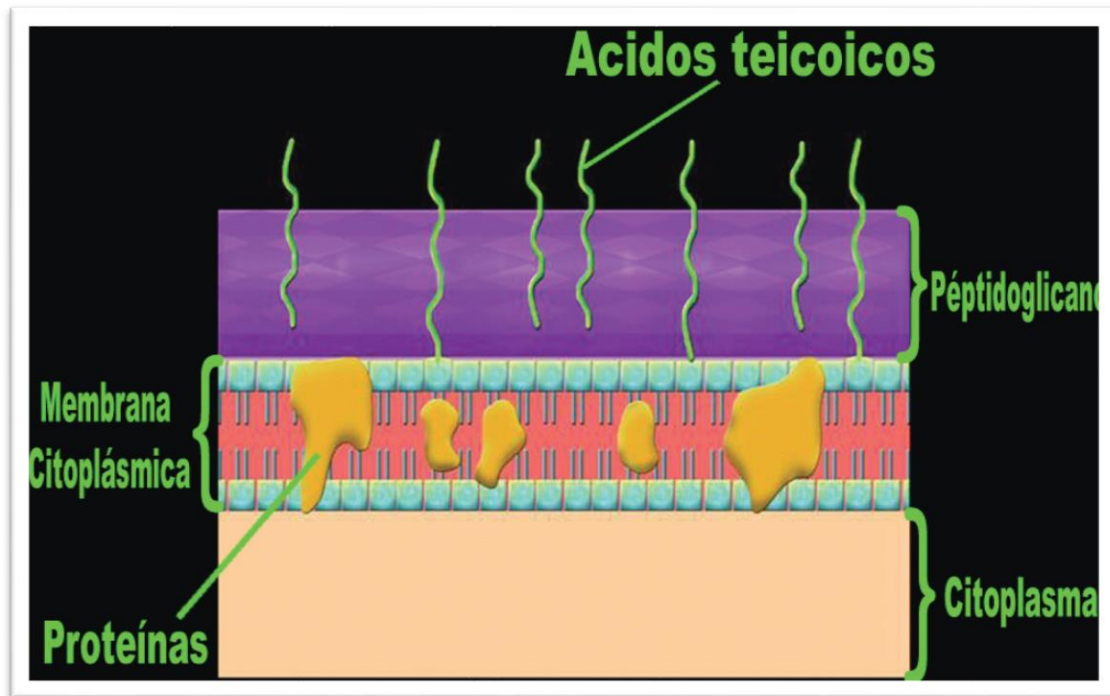
Saavedra, Chirinos. (2007). *El mundo de las abejas manual teorico de produccion de miel de abejas*. Lima-Peru: UNALM.

Zamora Luis Gabriel, A. M. (2011). Calidad microbiologica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijon. *Rev Biomed 2011, 22(2)*, 59-66.

Zamora, L. (2011). Calidad Microbiologica y actividad de abeja con aguijon. *Revista Biomedica, Vol.22(2)*: 59-66).

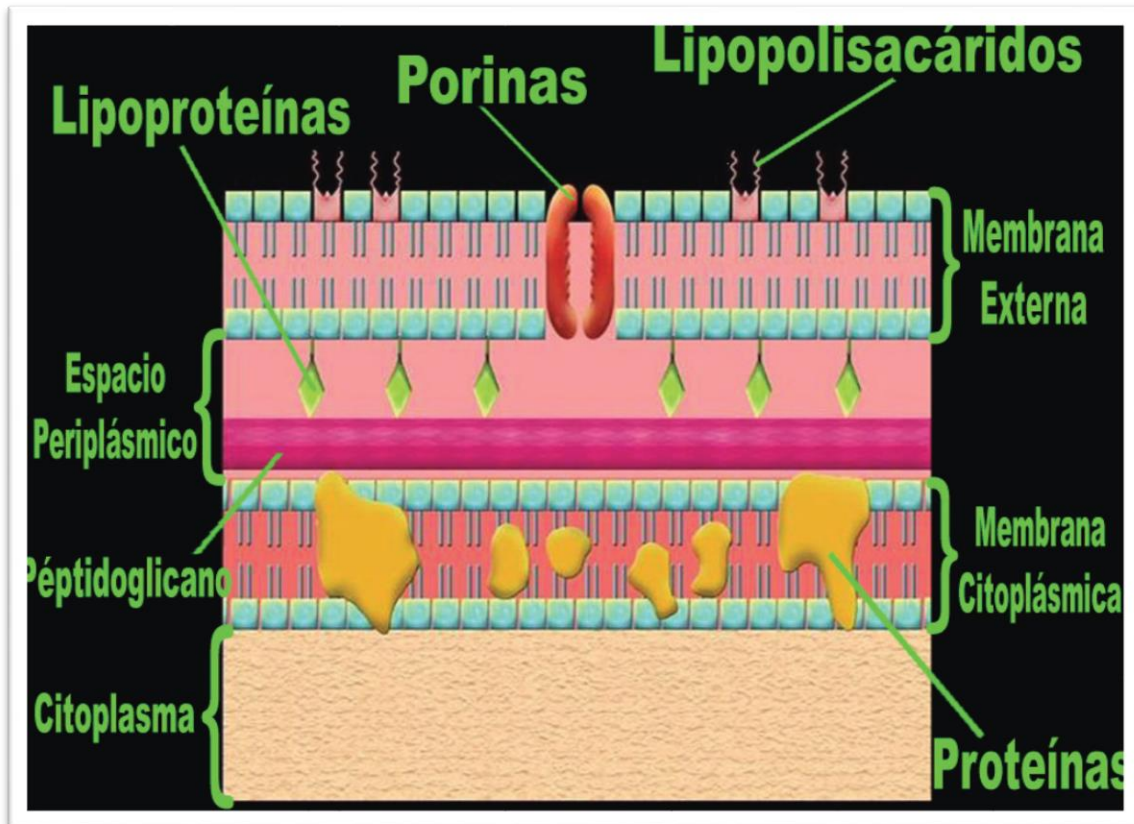
5.4 Anexos

Ilustración 1. Estructura de la pared celular de las bacterias Gram-positivas.



Fuente: Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana

Ilustración 2: Estructura de la pared celular de las bacterias Gram- negativa.



Fuente: Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana

Foto 1. Realizando cálculos para obtener la cantidad de miel a pesar.



Fuente: Propia.

Foto 2: Muestra de miel de abeja *Apis mellífera* utilizada en el estudio.



Fuente: propia

Foto 3: Pesando la miel para preparar las diluciones.



Fuente: Propia

Pesado de la miel previo a su disolución.

Foto 4: Preparación de las diluciones de la miel.



Fuente: propia

Foto 5: Diluciones de la miel preparadas.



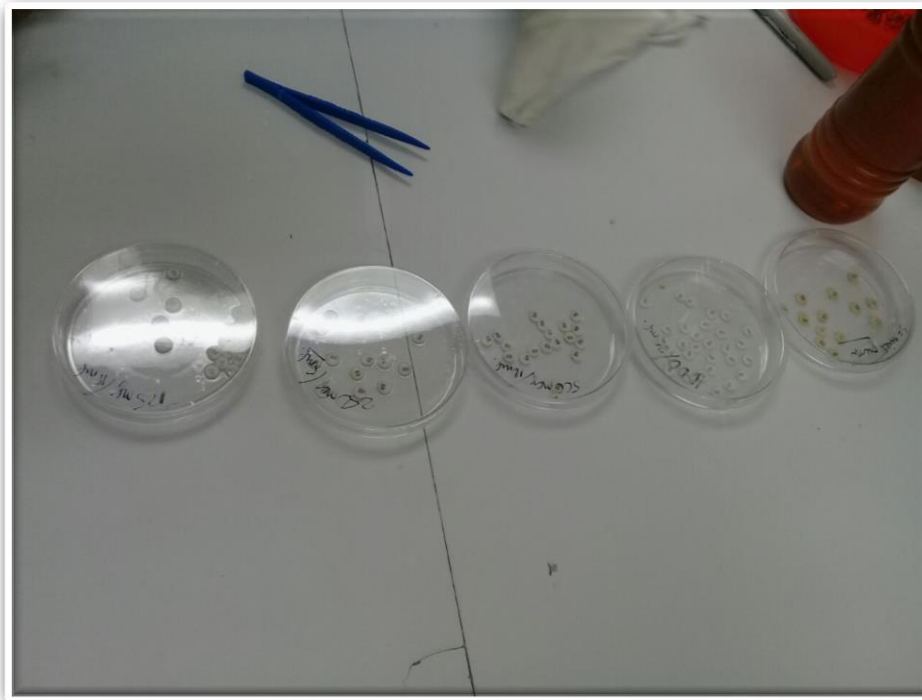
Fuente: propia

Foto 6: Preparación de los inóculos para la técnica de dilución en caldo.



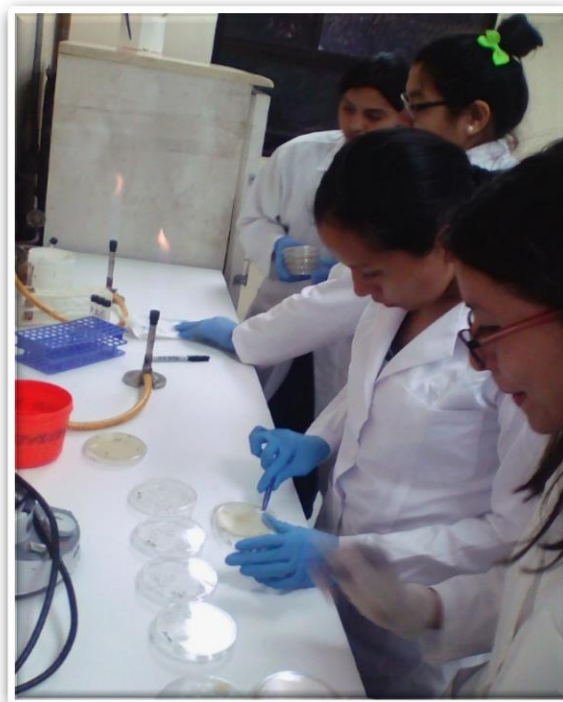
Fuente: propia

Foto 7: Sensidiscos impregnados con las diferentes concentraciones de miel.



Fuente: propia

Foto 8: Colocando los sensidiscos con las diferentes concentraciones en los platos Petri que contienen cada una de las bacterias.



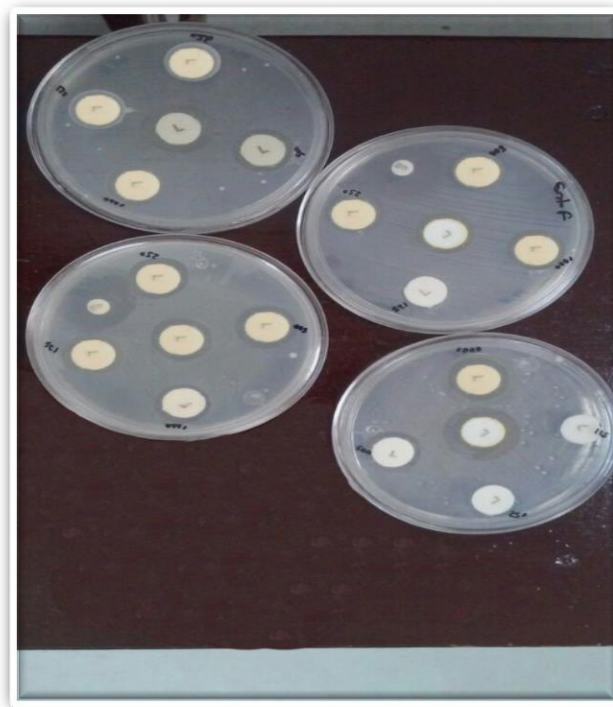
Fuente: propia

Foto 9: Halos de inhibición para *Staphylococcus aureus* obtenidos en la prueba de antibiograma.



Fuente: propia

Foto 10: Halos de inhibición para *Enterococcus faecalis* obtenidos en la prueba de antibiograma.



Fuente: propia

Foto 11: Halos de inhibición para *Escherichia coli* obtenidos en la prueba de antibiograma.



Propia: propia

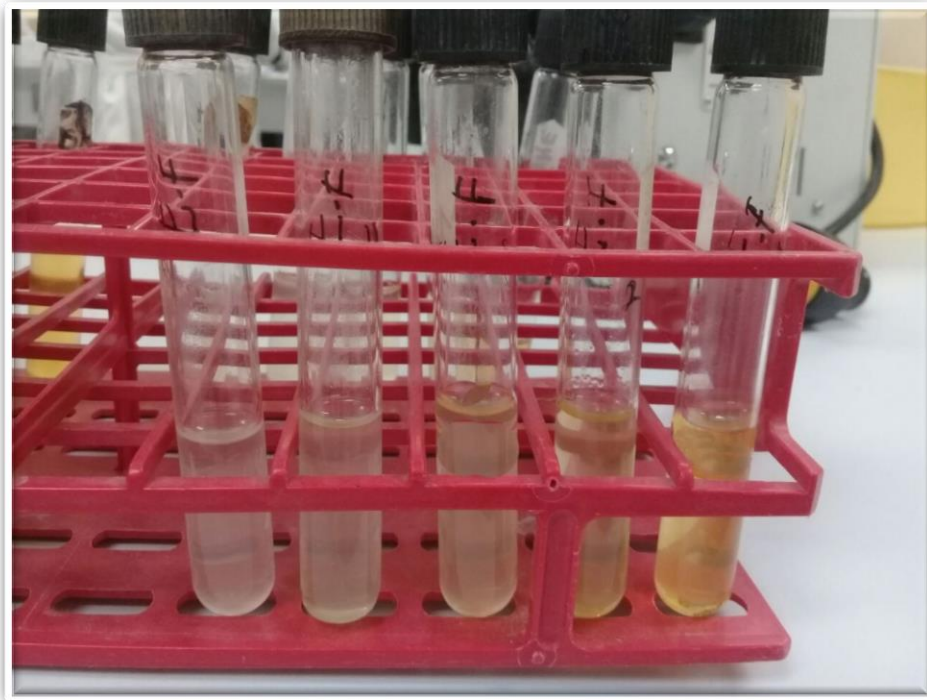
Foto 12: Prueba de dilución en caldo para determinar la CIM y la CBM en *Staphylococcus aureus*.



Fuente propia.

De acuerdo a la escala Mc.farland el grado de turbidez visualizado a una concentración de 75 ml de miel hubo efecto bacteriostático o efecto inhibitorio de la miel frente a *Staphylococcus aureus* siendo esta la concentración mínima inhibitoria; sin embargo no hubo efecto bactericida.

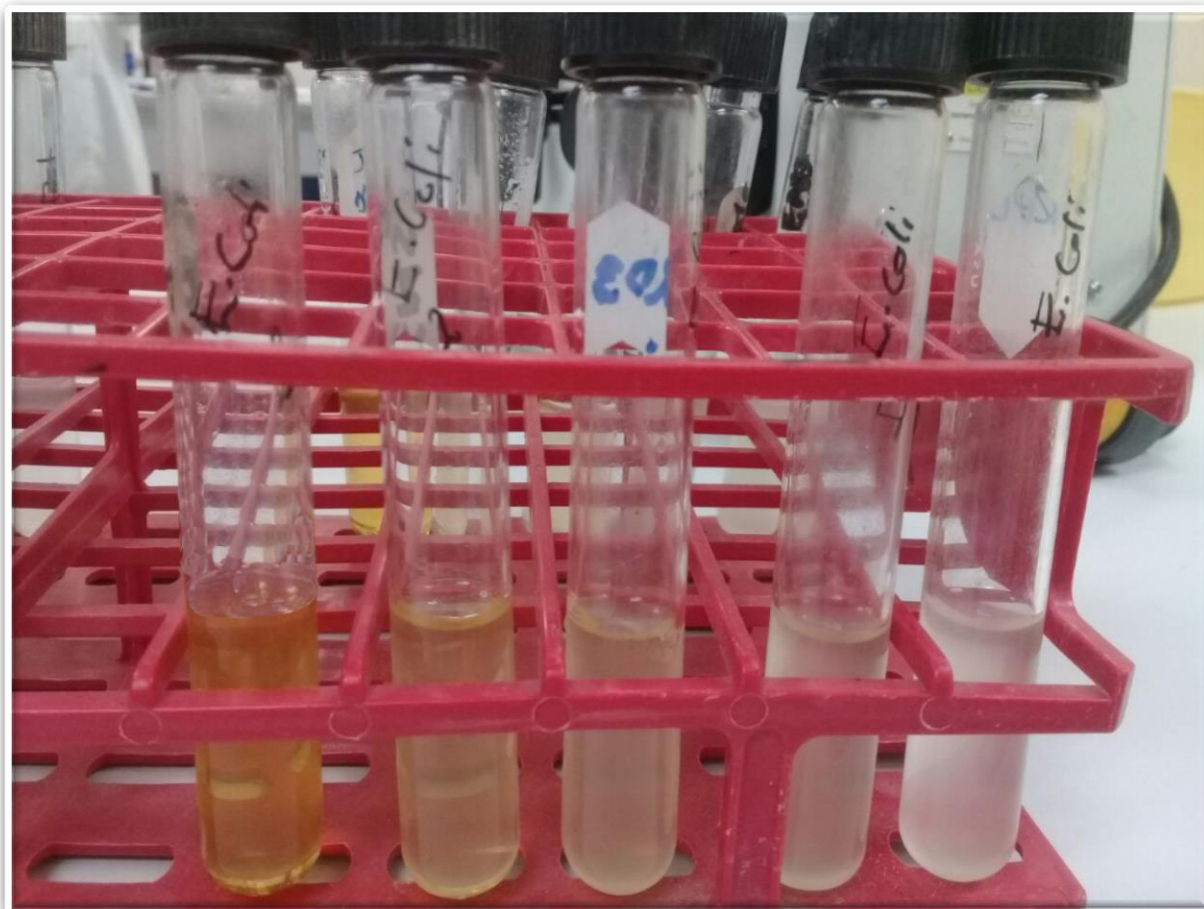
Foto 13: Prueba de dilución en caldo para determinar la CIM y la CBM en *Enterococcus faecalis*.



Fuente propia

Se puede observar que no hubo efecto antibacteriano de la miel frente a *Enterococcus faecalis*.

Foto 14: Prueba de dilución en caldo para determinar la CIM y la CBM en *Escherichia coli*.



Fuente propia.

Se puede observar que no hubo efecto antibacteriano de la miel frente a *Escherichia coli*.

Tabla 3: Halos de inhibición para *Staphylococcus aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923					
Miel	Numero de plato y tamaño de halo				Prom.4rep
Conc.	1 (mm)	2 (mm)	3 (mm)	4 (mm)	
Pura	15	15	15	15	15
1000 mg/ml	13	12	12	13	12.5
500 mg/ml	12	12	12	11	11.75
250 mg/ml	11	12	12	11	11.5
125 mg/ml	11	12	10	11	11
Control de antibiotico					
Cloranfenicol	29	28	29	29	28.75

Fuente: Ficha de recolección de datos.

Tamaño de halo de inhibición para *Staphylococcus aureus* frente a la miel de abeja *Apis mellifera*. Se puede observar efecto antibacteriano a todas las concentraciones y en todas las repeticiones y sus respectivos promedios; sin embargo es notorio el gradiente de concentración donde a mayor dilución de miel (menor concentración) menor tamaño de halo o menor efecto. El control (Cloranfenicol) Presento un tamaño de halo promedio de 28.75 mm siendo *Staphylococcus aureus* sensible, Cuyo rango establecido según la NCCLS, es mayor o igual a 18mm encontrándose dentro de los parámetros esperados.

Tabla 4: Halos de inhibición para *Enterococcus faecalis*.

<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 11700					
Miel	Numero de plato y tamaño de halo				prom.4 rep
Conc.	1 (mm)	2 (mm)	3 (mm)	4 (mm)	
pura	13	11	15	15	13.5
1000 mg/ml	11	11	13	14	11.7
500 mg/ml	9	10	10	0	9.5
250 mg/ml	9	8	9	0	6.5
125 mg/ml	8	8	6	0	5.50
Control de antibiotico					
Cloranfenicol	28	26	28	28	27.5

Fuente: Ficha de recolección de datos.

Tamaño de halo de inhibición para *Enterococcus faecalis* frente a la miel de abeja *Apis mellifera* a cinco concentraciones distintas. Se puede observar efecto antibacteriano solamente en tres de cuatro repeticiones para las concentraciones inferiores a miel 100% y 1000 mg/ml en las cuales si hubo efecto en las cuatro repeticiones, siendo los halos de inhibición de estas superiores a las de menor concentración, el efecto disminuye a medida que baja la concentración de miel. El control (Cloranfenicol) Presento un tamaño de halo de 27.5 mm siendo *Enterococcus faecalis* sensible, cuyo rango establecido según la NCCLS, es mayor o igual a 18mm encontrándose dentro de los parámetros esperados.

Tabla 5: Halos de inhibición para *Escherichia coli*.

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922					
Miel	Numero de plato y tamaño de halo				prom.4 rep
Conc.	1 (mm)	2 (mm)	3 (mm)	4 (mm)	
pura	13	12	13	10	12.0
1000 mg/ml	0	0	0	0	0
500 mg/ml	0	0	0	0	0
250 mg/ml	0	0	0	0	0
125 mg/ml	0	0	0	0	0
control de antibiotico					
Cloranfenicol	27	25	27	27	27

Fuente: Ficha de recolección de datos.

Tamaño de halo de inhibición para *Escherichia coli* frente a la miel de abeja *Apis mellifera* a cinco concentraciones distintas. Se puede observar efecto antibacteriano sola mente a concentración de miel 100% pura. El control (Cloranfenicol) Presento un tamaño de halo promedio de 23 mm, siendo *Escherichia coli* sensible, Cuyo rango establecido según la NCCLS, es mayor o igual a 18mm encontrándose dentro de los parámetros esperados.

Tabla 6: Clasificación como sensible, resistente e intermedio según la escala Duraffourd para *Staphylococcus aureus* frente la miel de abeja *Apis mellifera*.

Efecto inhibitorio de miel sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 según la escala de Duraffourd		
Concentración de Miel	Promedio. Halo (mm)	Escala Duraffourd
Pura	15	Muy sensible
1000	12	sensible
500	11	sensible
250	11	sensible
125	11	sensible

Interpretación del tamaño de los halos de inhibición según la escala Duraffourd.

Nula (-): para un diámetro inferior a 8 mm.

Sensibilidad al límite (sensible = +): para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.

Medio (muy sensible = ++): para un diámetro entre 14 y 20 mm.

Sumamente sensible (+++): para un diámetro superior a 20 mm.

Tabla 7: Clasificación como sensible, resistente e intermedio según la escala Duraffourd para *Enterococcus faecalis* frente la miel de abeja *Apis mellifera*.

Efecto inhibitorio de miel sobre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 11700 según la escala de Duraffourd		
Concentracion de Miel	Promedio. Halo (mm)	Escala Duraffourd
Pura	13	sensible
1000	11	sensible
500	9	sensible
250	8	sensible
125	7	Nula

Interpretacion del tamaño de los halos de inhibicion segun la escala Duraffourd.

Nula (-): para un diámetro inferior a 8 mm.

Sensibilidad al límite (sensible = +): para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.

Medio (muy sensible = ++): para un diámetro entre 14 y 20 mm.

Sumamente sensible (+++): para un diámetro superior a 20 mm.

Tabla 8: Clasificación como sensible, resistente e intermedio según la escala Duraffourd para *Escherichia coli* frente la miel de abeja *Apis mellifera*.

Efecto inhibitorio de miel sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 según la escala de Duraffourd		
Concentracion de Miel	Promedio. Halo (mm)	Escala Duraffourd
Pura	12	sensible
1000	0	Nula
500	0	Nula
250	0	Nula
125	0	Nula

Interpretacion del tamaño de los halos de inhibicion segun la escala Duraffourd.

Nula (-): para un diámetro inferior a 8 mm.

Sensibilidad al límite (sensible = +): para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.

Medio (muy sensible = ++): para un diámetro entre 14 y 20 mm.

Sumamente sensible (+++): para un diámetro superior a 20 mm.

La escala Duraffourd es una escala de medición aplicable a estudios botánicos, muy utilizada en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana utilizando sustancias meramente de origen natural como esencias, aceites esenciales, extractos, etc.

Esta escala de medición es aplicable a este estudio de susceptibilidad antimicrobiana ya que no hay medidas estándares o especificas emitidas por la NCCLS para evaluar el efecto de susceptibilidad antimicrobiana de la miel y otras sustancias de origen Natural.

Es por tal razón que en este estudio es más apropiado utilizar la escala de medición Duraffourd debido a que la miel es una sustancia de origen natural.

Tabla 9: Ficha de laboratorio

Tema: Efecto antibacteriano de la miel producida por la abeja <i>Apis mellifera</i> en microorganismos Gram + y Gram -, en los laboratorios del departamento de Bioanálisis clínico I.P.S	
Cepa bacteriana	Código
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 11700
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
Nº de ensayo y laboratorio	#1, laboratorio de bioanálisis clínico IPS.
Encargado(a) de laboratorio	María Inés Jirón Sequeira
Fecha de la practica	20-feb-18
Hora de entrada	03:30 p.m.
Hora de salida	06:30 p.m.
Métodos utilizados	Método de Kirby y Bauer o disco difusión. (Antibiograma. Método de dilución en caldo.
Materiales	Erlenmeyers estériles 125ml Pipetas estériles de 1ml Dispensadores Pipeta automática de 1ml Puntas de pipeta automática Gradillas aplicadores estériles Sensidiscos Platos Petri Tubos de ensayo
	Probetas, Asa Grigalski, Asa de punta redonda.

Tema: Efecto antibacteriano de la miel producida por la abeja <i>Apis mellifera</i> en microorganismos Gram + y Gram -, en los laboratorios del departamento de Bioanálisis clínico I.P.S	
Reactivos	<p>Agua peptonada al 0.1% Agar Mueller Hinton en placas Caldo Mueller Hinton Escala Mc.farland 0.5 Agar Mc Conkey Agar sangre Cepas inoculadas Cloro</p>
Equipos	<p>Vortex Agitadores magnéticos Pesa digital Mecheros Incubadora</p>
Resultados	<p>En la CMI no se obtuvieron resultados alentadores lo cual pudo ser debido a que el inculo estaba muy cargado y la concentración de la miel muy baja. En lo referente al antibiograma se observó mayor efecto inhibitorio en <i>Staphylococcus aureus</i> pura y a las distintas concentraciones.</p>

Tabla 10: Ficha de laboratorio

Tema: Efecto antibacteriano de la miel producida por la abeja <i>Apis mellifera</i> en microorganismos Gram + y Gram -, en los laboratorios del departamento de Bioanálisis clínico I.P.S	
Cepa bacteriana	Código
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 11700
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
Nº de ensayo y laboratorio	#2, laboratorio de bioanálisis clínico IPS.
Encargado(a) de laboratorio	María Inés Jirón Sequeira
Fecha de la practica	06 marzo 2018
Hora de entrada	3:00 PM
Hora de salida	5:20 PM
Métodos utilizados	Método de Kirby y Bauer o disco difusión. (Antibiograma). Método de dilución en caldo.
Materiales	Erlenmeyer estériles de 125 ml Pipetas estériles de 1ml Dispensadores Pipeta automática de 1ml Puntas de pipeta automática Gradillas Aplicadores estériles Sensidiscos Platos Petri Tubos de ensayo probetas Asa de punta redonda, Asa Grigalski

Tabla 11: Ficha de laboratorio

Tema: : Efecto antibacteriano de la miel producida por la abeja <i>Apis mellifera</i> en microorganismos Gram + y Gram -, en los laboratorios del departamento de Bioanálisis clínico I.P.S	
Reactivos	<p>Agua peptonada al 0.1% Agar Mueller Hinton en placas Caldo Mueller Hinton Cepas inoculadas Escala Mc.farland 0.5</p>
Equipos	<p>Vortex Agitadores magnéticos Pesa digital Mecheros Incubadora</p>
Resultados	<p>Luego de 24 horas de incubación se procedió a la lectura de La CIM observando solo efecto en <i>Staphylococcus aureus</i> observando que en el tubo 8 hubo menor turbidez que en los demás tubos, no así en <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Escherichia coli</i> donde no se evidencio efecto inhibitorio; posteriormente se procedió a la lectura del antibiograma obteniendo halos de inhibición en todas las cepas bacteriana en concentración pura siendo más sensible a la miel en concentración pura y diluida <i>Staphylococcus aureus</i> y siguiéndole <i>Enterococcus faecalis</i>. <i>Escherichia coli</i> resulto ser resistente a todas las diluciones de miel pero no en estado pura.</p>

Tabla 12: Patrones estándar del halo de inhibición y diámetro del halo de inhibición para la cepa *E. coli* ATCC 25922 empleada como control de calidad, elaborado con datos del NCCLS.

GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)		<i>E. coli</i> ATCC 25922 intervalo ^b
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
C	Ceftazidima ^a	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	25-32
	Aztreonam ^a	30	≤15	16-21	≥22	≥32	≤8	28-36
	Kanamicina	30	≤13	14-17	≥18	≥25	≤6	17-25
	Netilmicina	30	≤12	13-14	≥15	≥32	≤12	22-30
	Tobramicina	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4	18-26
	Tetraciclina ^c	30	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4	18-25
	Cloranfenicol ^d	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8	21-27
D	Carbenicilina	100	≤19	20-22	≥23	≥64	≤16	23-29
	Cinoxacino	100	≤14	15-18	≥19	≥64	≤16	26-32
	Lomefloxacino	10	≤18	19-21	≥22	≥8	≤2	--
	Norfloxacino	10	≤12	13-16	≥17	≥16	≤4	28-35
	Ofloxacino	5	≤12	13-15	≥16	≥8	≤2	29-33
	Loracarbef ^f	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	23-29
	Nitrofurantoina	300	≤14	15-16	≥17	≥128	≤32	20-25
	Sulfisoxazol	250 o 300	≤12	13-16	≥17	≥350	≤100	15-23
	Trimetoprim	5	≤10	11-15	≥16	≥16	≤4	21-28
	Fosfomicina	200	≤12	13-15	≥16	≥256	≤64	22-30

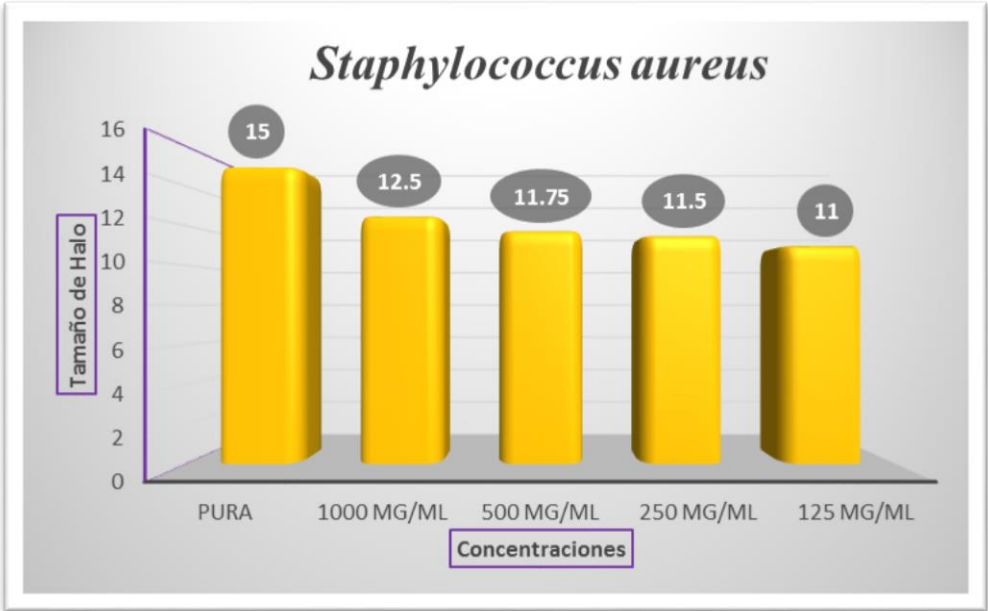
Es importante hacer mención en que en este estudio se utilizó como control de antibiótico el cloranfenicol teniendo una carga del disco de 30 µg, el cual presento halos de inhibición aceptables por los patrones estándar de halo de inhibición y diámetro de halos de inhibición para la cepa *E. coli* ATCC 25922 empleada como control de calidad establecidos por la NCCLS.

Tabla 13: : Patrones estándar del halo de inhibición para estafilococos y diámetro del halo de inhibición para la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 empleada como control de calidad, elaborado con datos del NCCLS.

GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)		S. aureus ATCC 25923 Intervalo ^a
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
A	Penicilina G ^{ku}	10 U	<28	..	≥29	β-lactamasa ^b	<0.1	26-37
	Oxacilina ^b (<i>S. aureus</i>)	1	≤10	11-12	≥13	≥4	<2	18-24
	(<i>Stafilococcus coagulasa</i> -)	1	≤17	..	≥18	≥0.5	<0.25	..
B	Vancomicina ^d	30	≥15	≥32	≤4	17-21
	Teicoplanina	30	≤11	11-13	≥14	≥32	≤8	15-21
	Eritromicina ^e	15	≤13	14-22	≥23	≥8	≤0.5	22-30
	Claritromicina ^e	15	≤13	14-17	≥18	≥8	≤2	26-32
	Azitromicina ^e	15	<13	14-17	>18	>8	<2	21-26
	Clindamicina ^e	2	<14	15-20	>21	>4	<0.5	24-30
	Trimetoprim / sulfametoxazol	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16	≥8/152	≤2/38	24-32
C	Gentamicina	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4	19-27
	Ciprofloxacino	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1	22-30
	Ofloxacino	5	≤12	13-15	≥16	≥8	≤2	24-28
	Levofloxacino	5	<13	14-16	≥17	≥8	<2	25-30
	Cloranfenicol ^h	30	<12	13-17	≥18	≥32	≤8	19-26
	Rifampicina ^{hi}	5	<16	17-19	>20	≥4	≤1	26-34
	Tetraciclina ^{hu}	30	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4	24-30
D	Norfloxacino	10	≤12	13-16	≥17	≥16	≤4	17-28
	Lomefloxacino	10	<18	19-21	>22	>8	<2	23-29
	Nitrofurantoina	300	<14	15-16	≥17	≥128	≤32	18-22
	Sulfisoxazol	250 o 300	≤12	13-16	≥17	≥350	≤100	24-34
	Trimetoprim	5	<10	11-15	≥16	≥16	≤4	19-26

Es importante hacer mención en que en este estudio se utilizó como control de antibiótico el cloranfenicol teniendo una carga del disco de 30 µg, el cual presento halos de inhibición aceptables por los patrones estándar de halo de inhibición y diámetro de halos de inhibición para la cepa *S. aureus* ATCC 25923 empleada como control de calidad establecidos por la NCCLS.

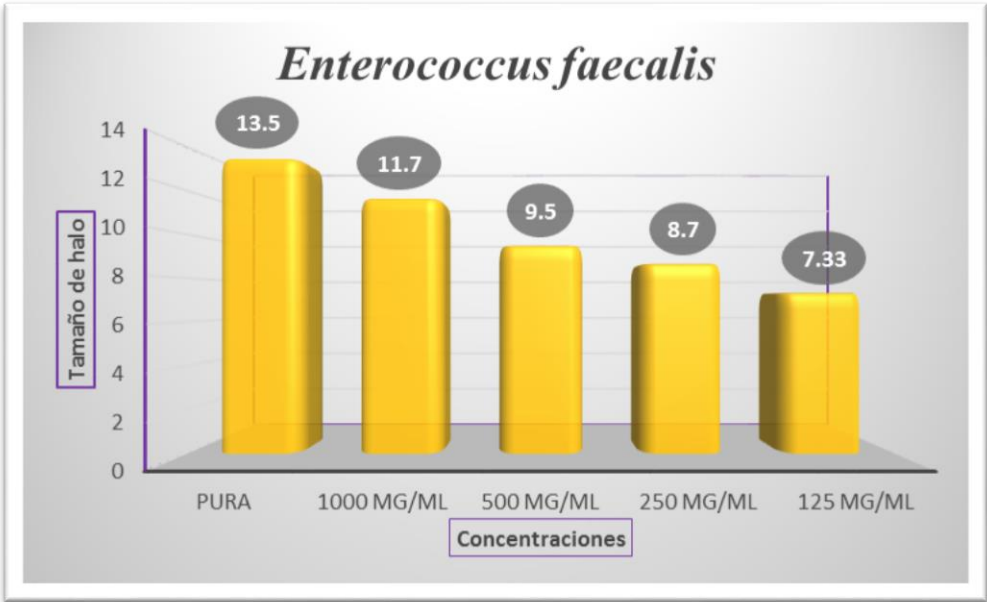
Grafico 1: Tamaño de halo de inhibición vs concentración de miel de abejas *Apis mellifera* para *Staphylococcus Aureus*.



Fuente: Propia.

Se puede observar que al disminuir la concentración de la miel el efecto inhibitorio disminuye siendo así la concentración directamente proporcional al efecto inhibitorio para *Staphylococcus aureus*.

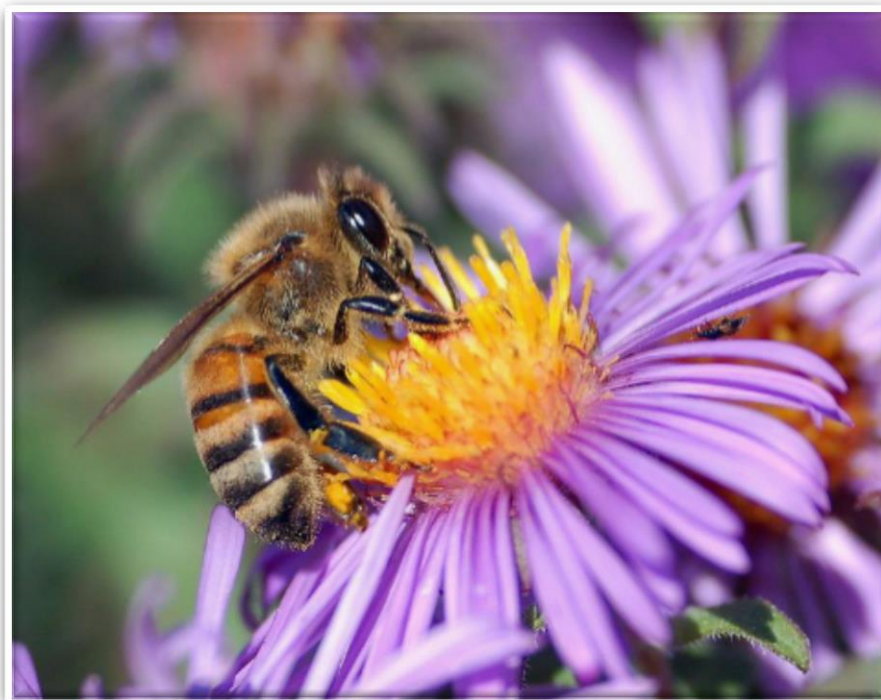
Grafico 2: Tamaño de halo de inhibición vs concentración de miel de abejas *Apis mellifera* para *Enterococcus faecalis*.



Fuente: Propia.

Se puede observar que hubo mayor efecto antibacteriano a mayor concentración de la miel ya que este se ve disminuido al disminuir o diluir la miel.

Imagen 1: Abeja *Apis mellifera* libando las flores más comunes de los alrededores de la laguna de apoyo.



Fuente: Imágenes abeja *Apis mellifera*

Imagen 2: Abeja *Apis mellifera* libando las flores más comunes de los alrededores de la laguna de apoyo.



Fuente: Imágenes abeja *Apis mellifera*

5.5. Glosario

A

Ácidos fenólicos: Los ácidos fenólicos o ácidos fenolcarboxílicos son un tipo de compuestos orgánicos, que le confieren efecto cicatrizante a la miel.

Anaerobio: Que es capaz de vivir o desarrollarse en un medio sin oxígeno.

Acetoina: La Acetoina es un compuesto orgánico producido de forma natural por las levaduras del género *saccharomyces* durante la fermentación alcohólica.

Agua peptonada: El agua peptonada es un medio de crecimiento mínimo.

B

Bacteriemia: Bacteriemia, es la presencia de bacterias en la sangre.

Betalactamasas: La betalactamasa es una enzima producida por algunas bacterias y es responsable de la resistencia de éstas ante la acción de antibióticos betalactámicos como las penicilinas, las cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos.

C

Catalasa: La catalasa es una enzima perteneciente a la categoría de las oxidoreductasas que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.

E

Endocarditis: La endocarditis es una enfermedad que se produce como resultado de la inflamación del endocardio; es decir, un proceso inflamatorio localizado en el revestimiento interno de las cámaras y válvulas cardíacas.

Endósporas: Las endósporas son células especializadas, no reproductivas, producidas por algunas bacterias.

F

Flavonoides: Flavonoide es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas.

Fitoquímicos: son sustancias que se encuentran en los alimentos de origen vegetal, biológicamente activas, que no son nutrientes esenciales para la vida.

I

Inhibina: La Inhibina es la sustancia que consigue que la miel aporte beneficios antimicrobianos.

Integrones: Los integrones son mecanismos genéticos que permiten a las bacterias adaptarse y evolucionar rápidamente a través del almacenamiento y la expresión de nuevos genes.

Indol: El indol es un compuesto orgánico heterocíclico, con estructura bicíclica que consiste en un anillo de seis miembros unido a otro de cinco miembros.

N

Néctar: Es un líquido rico en azúcar producido por las flores de las plantas.

P

Peróxido de hidrógeno: Esta enzima ayuda a transformar la sacarosa en dos partes iguales de glucosa y fructosa. ... La glucosa es más fácil de digerir y es lo que convierte a la miel en dulce. Otra enzima, la glucosa oxidasa, rompe la glucosa y estabiliza el pH de la miel. La catalasa transforma el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

Péptidoglucano: El peptidoglucano o peptidoglucano es el componente principal de la pared bacteriana.

T

Transposones: Los transposones son secuencias genéticas especializadas “móviles” que son capaces de transportar genes de resistencia antimicrobiana.

Triptofano: El triptófano es un aminoácido esencial en la nutrición humana.

Timina: Una de las cuatro bases nitrogenadas contenidas en los ácidos nucleicos y que intervienen en el código genético.