

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA



EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE LA MIEL DE ABEJA
“*Apis mellifera*” DEL CENTRO APICULTOR “RINCONADA ALTA”
DEL DISTRITO DE LURIN FRENTE A LA CEPA DE *Streptococcus*
***pneumoniae* ATCC 49619**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO Y BIOQUÍMICO

TESISTA:

Bach. MARIA ANGELICA BELLIDO GUTIERREZ

ASESOR:

Mg. Q.F. LUIS ROA CHUNGA

Fecha de Sustentación 12.02.2018

LIMA – PERÚ

2018

TÍTULO:

**EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE LA MIEL DE ABEJA
“*Apis mellifera*” DEL CENTRO APICULTOR “RINCONADA ALTA”
DEL DISTRITO DE LURIN FRENTE A LA CEPA DE *Streptococcus*
pneumoniae ATCC 49619**

DEDICATORIA

A mí querida hija Christina por ser mi motivo de superación.

A Dios y mi madre que siempre me acompañan y guían mi camino.

A mi familia que siempre me brinda su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTO

A dios, por guiar mi camino y poner a mí paso a todas aquellas personas que generosamente contribuyeron a que este trabajo se pueda realizar.

Agradezco a todo el equipo de la Subunidad de Investigación e Innovación Tecnológica del Instituto Nacional del Niño - San Borja por su valioso apoyo, en especial a las doctoras María Cristina Medina y Billie Velapatiño, por su invaluable asesoría en el trabajo de campo.

Al Químico Farmacéutico Guillermo Gallardo quien me incentivo a realizar este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	
Agradecimiento	
Índice de Tablas	
Índice de Figuras	
Índice de Anexos	
Resumen	
Abstract	
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1 DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA.....	3
1.2 IDENTIFICACION Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	5
1.2.1 PROBLEMA GENERAL.....	5
1.2.2 PROBLEMAS ESPECÍFICOS	5
1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION.....	6
1.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	6
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
1.4 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACION.....	7
1.5 LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN	8
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO	9
2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION.....	9
2.1.1 ANTECEDENTES NACIONALES.....	9

2.1.2 ANTECEDENTES INTERNACIONALES	10
2.2 BASES TEÓRICAS.....	12
2.2.1 STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE.....	12
2.2.1.1 Morfología	12
2.2.1.2 Clasificación taxonómica.....	13
2.2.1.3 Factores de virulencia	13
2.2.1.4 Patogénesis.....	14
2.2.1.5 Defensas del hospedero.....	15
2.2.1.6 Epidemiología.....	16
2.2.1.7 Importancia Clínica.....	17
2.2.2 PRODUCTOS DE LA COLMENA	18
2.2.2.1 Miel de Abeja.....	18
2.2.2.2 Polinización:	18
2.2.2.3 Recolección o cosecha de Miel de Abeja.....	19
2.2.2.4 Métodos de Cosecha de la Miel	19
2.2.2.5 Clasificación	20
2.2.2.6 Control de Calidad.....	20
2.2.2.7 Características Organolépticas	21
2.2.2.8 Identificación de Metabolitos primarios y secundarios ...	21
2.2.2.9 Características Físico-químicas	22
2.2.2.10 Parámetros microbiológicos según el MINSA	26
2.2.2.11 Composición nutricional de la miel de Abeja.....	27
2.2.2.12 Actividad biológica.....	28
2.2.2.13 Actividad Antibacteriana de la miel.....	29
2.2.2.14 Factores Involucrados en la pérdida de la actividad Antibacteriana	30
2.2.2.15 La miel y su uso en medicina	31

2.2.2.16 Efectos adversos.....	32
2.2.2.17 Síntomas de Alergia a la Miel.....	33
2.2.3 RINCONADA ALTA.....	33
2.3 FORMULACION DE HIPÓTESIS	34
2.3.1. HIPÓTESIS GENERAL	34
2.3.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS.....	34
2.4 Variables.....	35
2.4.1 Tabla de Operacionalización de Variables	35
2.5 DEFINICION DE TERMINOS BASICOS.....	36
CAPITULO III: METODOLOGIA.....	37
3.1 TIPO Y NIVEL DE LA INVESTIGACION.....	37
3.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACION.....	37
3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA DE LA INVESTIGACION.....	38
3.3.1 POBLACIÓN.....	38
3.3.2 MUESTRA	38
3.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	38
3.5 TECNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE DATOS.....	38
3.5.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	38
CAPITULO IV: PRESENTACION Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS	44
4.1 PROCESAMIENTO DE DATOS: Resultados	44
4.2 CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS.....	50
4.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	50
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	52
5.1 CONCLUSIONES	52
5.2 RECOMENDACIONES.....	53
BIBLIOGRAFÍA	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1	Identificación de metabolitos primarios de dos muestras de miel de abeja en dos departamentos del Perú.....	21
Tabla N° 2	Identificación de metabolitos secundarios de dos muestras de miel de abeja en dos departamentos del Perú.....	22
Tabla N° 3	Estándares Fisicoquímicos del Codex alimentario y Unión Europea.....	25
Tabla N° 4	Otros estándares Fisicoquímicos.....	25
Tabla N° 5	Requerimientos microbiológicos en miel, jalea real y productos similares.....	26
Tablas N° 6	Composición nutricional de la miel de Abeja.....	27
Tabla N° 7	valores obtenidos del análisis físico- químico.....	39
Tabla N° 8	Registro Microbiológico de la inhibición de miel sobre S. pneumoniae ATCC 49619	45
Tabla N° 9	Medidas de los halos de inhibición, valor de la mediana, media, desviación estándar e intervalos de confianza....	46
Tabla N° 10	Efecto inhibitorio in vitro de miel sobre Streptococcus pneumoniae ATCC 49619 según la escala de Duraffourd.....	48
Tabla N° 11	Resumen 95% del Intervalo de Confianza con el post-test de comparación múltiple de Dunnett.....	50

ÍNDICE DE FIGURA

Figura N° 1	Mediana de los halos de inhibición.....	47
Figura N° 2	Efecto inhibitorio de la miel de abeja (<i>Apis mellifera</i>) sobre <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619.....	49

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1	Certificado <i>Streptococcus pneumoniae</i>	59
Anexo N° 2	Certificado Agar Muller Hinton suplementado	60
Anexo N° 3	Ficha de recolección de datos.....	61
Anexo N° 4	Resultado de análisis estadístico usando “one-way analysis of variance” con el post-test de comparación múltiple de Dunnett....	62
Anexo N° 5	Testimonios fotográficos.....	63

RESUMEN

El estudio tiene como objetivo determinar el efecto antibacteriano *in vitro* de la miel de abeja (*Apis mellifera*) de origen multifloral frente a la cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. Para determinar la actividad antibacteriana se utilizó el método de pozos en agar modificado y el método de Kirby-Bauer, se obtuvo miel de abeja multifloral procedente del distrito de Lurín, Lima – Perú; y se realizó las diluciones para obtener concentraciones de 25%, 50% y 75% en discos de papel filtro. Cada concentración se colocó en una placa de agar Müller - Hinton suplementada, que previamente fue sembrada con una suspensión de *S. pneumoniae* ATCC 49619 a una turbidez 0.5 de la escala de Mc Farland. Se incubó las placas en condiciones de anaerobiosis y se midió los respectivos halos de inhibición después de 24 horas. Se observó halos (mm) en las concentraciones de 25% (**8 ± 2**), 50% (**9.3 ± 1.1**) y al 75% (**17.3 ± 1.1**). Siendo la concentración de 75% estadísticamente significativa ($P < 0.001$). Los resultados del presente trabajo evidencian el efecto antibacteriano que tiene la miel de abeja a concentraciones superiores al 50% sobre el *Streptococcus pneumoniae*.

Palabras clave: Efecto antibacteriano, *Streptococcus pneumoniae*, miel de abeja, halo de inhibición.

ABSTRAC

The objective of the study is to determine the in vitro antibacterial effect of the multifloral honey bee (*Apis mellifera*) against the strain of *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. To determine the antibacterial activity, the modified agar well method and the Kirby method were used. -Bauer, honey was obtained from the district of Lurin, Lima - Peru; and the dilutions were made to obtain concentrations of 25%, 50% and 75% in filter paper discs. Each concentration was placed on a supplemented Müller-Hinton agar plate, which was previously seeded with a suspension of *S. pneumoniae* ATCC 49619 at a turbidity 0.5 of the Mc Farland scale. The plates were incubated under anaerobic conditions and the respective inhibition zones were measured after 24 hours. Halos (mm) were observed in the concentrations of 25% (8 ± 2), 50% (9.3 ± 1.1) and 75% (17.3 ± 1.1). The concentration being 75% statistically significant ($P < 0.001$). The results of the present work show the antibacterial effect of honey at concentrations higher than 50% on *Streptococcus pneumoniae*.

Key words: Antibacterial effect, *Streptococcus pneumoniae*, honey, inhibition halo

INTRODUCCIÓN

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. Para apreciar sus propiedades particulares, no requiere procesamiento o purificación alguna. Si bien al comienzo se usó exclusivamente con fines religiosos o medicinales, posteriormente los griegos y romanos lo incorporaron como ingrediente a su dieta. Durante siglos constituyó el único endulzante utilizado, hasta que en los últimos 100 años fue reemplazado totalmente por el azúcar de caña. (1)

En muchas partes del mundo la miel es utilizada como medicina o jarabe y como tratamiento especial para niños. (2) La medicina moderna está aumentando el uso de la miel en una gran variedad de tratamientos. Asimismo, 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. La miel es un producto utilizado en la cura de heridas y en tratamientos de la piel: sus propiedades higroscópicas ayudan a secar las heridas, y su permeabilidad permite que el oxígeno la atraviese. (2)

Hay numerosos investigadores que han reportado la efectividad de la miel como antibacteriano: Por ejemplo, Molan comprobó la naturaleza de la actividad antibacteriana de la miel de abeja, (3) lo mismo que Molan y Cooper investigaron sobre la actividad antibacteriana de la miel contra cepas de *Staphylococcus aureus* de heridas infectadas. (4)

Es por tal razón, que este trabajo se ha enfocado en probar la efectividad de la miel como agente antibacteriano frente a la cepa de *Streptococcus pneumoniae*, considerando las aplicaciones que podría tener como alternativa a los antibióticos producidos en el mercado farmacéutico.

El primer capítulo, denominado el problema de la investigación, la descripción de la realidad problemática, formulación del problema general y los específicos, del objetivo general y los específicos, así como la justificación e importancia del estudio.

El segundo capítulo, marco teórico, incluye antecedentes del estudio dentro de los cuales se encuentran los nacionales y extranjeros, luego las bases teóricas, las hipótesis general y específicas, las variables, la tabla de operacionalización de variables, terminando con el marco conceptual.

El tercer capítulo, método, aborda lo correspondiente al tipo de estudio, diseño a utilizar, población, muestra y procesamiento de datos.

El cuarto capítulo, que trata de la presentación y análisis de resultados, incluye además la contrastación de hipótesis y discusión de resultados.

Finalmente, el quinto capítulo permite incorporar las conclusiones y recomendaciones del estudio.

Asimismo, se agregan secciones como la bibliografía y los anexos conteniendo los instrumentos de la investigación.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA.

Las cifras de resistencia del *Streptococcus pneumoniae* a los antibióticos descritas en América, comparadas con otros continentes, son menores; sin embargo, se está observando un rápido incremento de las cifras en los últimos años. Se reporta, por ejemplo, para Estados Unidos (8%), Brasil (17%), Chile (22%) (4,7). En nuestro medio, los trabajos de investigación son escasos y difieren metodológicamente, por lo que sus resultados no pueden dar certeza de la magnitud de este problema. (5)

La resistencia del *S. pneumoniae* a los antibióticos, específicamente la penicilina, es un problema creciente. El desarrollo de cepas resistentes a la penicilina se da gradualmente. La resistencia obedecería a mutaciones genéticas repetidas de la bacteria y por presión selectiva debido al uso indiscriminado de antibióticos. En nuestro país los niveles de resistencia del *S. pneumoniae* a la penicilina han ido aumentando; sin embargo, los estudios se han limitado principalmente a Lima. (6)

En los últimos 10 años, el Grupo Peruano de Investigación en Neumococo ha realizado importantes aportes, uno de ellos denominado Resistencia Antibiótica y Distribución de Serotipos de *Streptococcus pneumoniae* en el Perú, para conocer la carga de enfermedad, la distribución de serotipos y la resistencia antibiótica del neumococo a nivel nacional, en casos de neumonía se continúa considerando a las penicilinas como la terapia de elección. (5)

Asimismo, se evidencia la necesidad de implementar estrategias para reducir el uso irracional de antibióticos y disminuir los patrones de resistencia. Se recomienda un control adecuado, capacitación y actualización permanente al

personal de salud, adecuada selección de antibióticos y duración de la prescripción, regulaciones para restringir la venta indiscriminada de antibióticos en las farmacias, y concientizar a la población sobre los efectos de la automedicación; todas estas medidas contribuirían a una disminución significativa de los patrones de resistencia antibiótica en una población. (7)

Otro de los estudios realizados en el año 2008, denominado Sensibilidad antibiótica de *Streptococcus pneumoniae* en portadores nasofaríngeos en niños sanos menores de un año en Lima, Perú, llegó a la conclusión de que los elevados niveles de resistencia encontrados para penicilina, cotrimoxazol y macrólidos en todas las regiones estudiadas, y su asociación con uso previo de antibióticos, representan un importante problema de salud pública en nuestro país. Se requiere tomar medidas de prevención para disminuir la emergencia y diseminación de cepas resistentes en nuestro país. (8)

Es así como, paralelo al desarrollo tecnológico de la industria farmacéutica y de la floreciente medicina alternativa, existe un gran interés por parte de los investigadores en estudiar sustancias naturales que poseen propiedades farmacológicas antibacterianas. Entre ellas, tenemos a la miel de abeja, la cual ha sido utilizada en la medicina por años por sus propiedades medicinales atribuidas en su uso tradicional y sobre las cuales se han reportado estudios tanto in vivo como in vitro de su amplio espectro como agente antibacteriano, y no es tóxico para el tejido humano. A pesar de la falta de apoyo promocional por parte del Estado, el interés en su uso ha ido aumentando en los últimos años. (9)

De acuerdo a un estudio realizado por Molan, denominado actividad antibacteriana de la miel realizado en el año 1992, se demostró convincentemente que la miel tiene una potente actividad antibacteriana, efectiva contra un espectro muy amplio de especies; y también tiene propiedades antifúngicas. La actividad observada con soluciones diluidas de miel indica claramente que hay mucho más que un alto contenido de azúcar involucrada en su acción antibacteriana. Esta actividad antibacteriana adicional se debe al peróxido de hidrógeno producido por la actividad enzimática en la miel, y en algunas mieles también hay sustancias antibacterianas derivadas de plantas. (3)

Otro estudio realizado por los investigadores Frech, Cooper y Molan, acerca de la actividad antibacteriana de la miel contra estafilococos coagulasa negativos, concluyeron que las mieles típicas son unas ocho veces más potentes contra los estafilococos coagulasa negativos, que si la inhibición bacteriana se debiera a su osmolaridad sola. Por lo tanto, la miel aplicada a la piel en los puntos de inserción de dispositivos médicos puede tener un papel en el tratamiento o prevención de infecciones contra estafilococos coagulasa negativos. (4)

Por las razones expuestas anteriormente, el propósito de este estudio es evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* de la miel de abeja frente al *Streptococcus pneumoniae* y utilizar estos resultados a futuro en otras investigaciones como actividades sinérgicas frente a antibióticos que están en el mercado, con la finalidad de generar mayor evidencia científica.

1.2 IDENTIFICACION Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1 PROBLEMA GENERAL

¿Cuál es el efecto antibacteriano *in vitro* de la miel de abeja “*Apis mellifera*” frente a la cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619?

1.2.2 PROBLEMAS ESPECÍFICOS

- 1- ¿De qué manera la concentración de la miel de abeja “*Apis mellifera*” al 25% tiene efecto antibacteriano frente a la cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619?
- 2- ¿De qué manera la concentración de la miel de abeja “*Apis mellifera*” al 50% tiene efecto antibacteriano frente a la cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619?
- 3- ¿De qué manera la concentración de la miel de abeja “*Apis mellifera*” al 75% tiene efecto antibacteriano frente a la cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619?

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* de la miel de abeja "*Apis mellifera*" frente a la cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Determinar el efecto antibacteriano de la miel de abeja "*Apis mellifera*" al 25% frente a la cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619?
- 2- Determinar el efecto antibacteriano de la miel de abeja "*Apis mellifera*" al 50% frente a la cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619?
- 3- Determinar el efecto antibacteriano de la miel de abeja "*Apis mellifera*" al 75% frente a la cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619?

1.4 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACION

Actualmente, la resistencia a los antibióticos es un problema de Salud Pública, sobre todo a nivel de Latinoamérica donde la tendencia de la población es a la automedicación, de allí que se considera una emergencia y diseminación mundial (10). Por otro lado, a nivel internacional, muchas publicaciones confirman el efecto antimicrobiano de la miel de abeja contra diversos aislados microbiológicos. El presente estudio evaluara el efecto antibacteriano de la miel de abeja frente a *Streptococcus pneumoniae*, este microorganismo forma parte de la flora bacteriana normal de la mucosa nasal y faríngea, siendo su ubicación en el tracto respiratorio superior, transmitiéndose con facilidad de persona a persona a través de las gotitas de saliva. (11) Sin embargo, esta bacteria puede causar desde infecciones focales como otitis media aguda y sinusitis hasta infecciones invasivas como bacteriemias, neumonía bacteriana y meningitis bacteriana en individuos inmunosuprimidos (12) y es un problema de salud pública en estas poblaciones debido a que esta bacteria presenta resistencia a los antimicrobianos tales como macrólidos, sulfamidas tetraciclinas, etc. (13) La miel de abeja tiene un precio asequible lo cual lo hace accesible para las poblaciones de bajos recursos y además contiene componentes tales como carbohidratos, flavonoides, vitaminas, peróxido de hidrogeno, etc. uno de los componentes, el metil-glioxal, se considera altamente citotóxico bacteriano que podría ser de utilidad para posibles tratamientos alternativos o en conjunto con otras drogas.

Esta investigación es trascendente, porque sería una alternativa de tratamiento terapéutico frente a la alarma mundial de resistencia bacteriana que enfrentamos actualmente a fármacos tradicionales utilizados con poco éxito contra el neumococo, que es el agente más asociado con la mortalidad infantil (14) Además, el tratamiento genera un alto costo social y económico a nuestro sistema de salud. (15)

Los resultados de este estudio contribuirán al conocimiento del efecto antibacteriano de la miel de abeja de procedencia local sobre el *Streptococcus pneumoniae*. Estos conocimientos podrían servir para crear estrategias de tratamiento en poblaciones de bajos recursos económicos.

1.5 LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN

- La limitación principal del presente estudio fue la obtención de la cepa *Streptococcus pneumoniae*.
- Otra limitación fue la accesibilidad de un laboratorio microbiológico para poder trabajar las cepas bacterianas.

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION

2.1.1 ANTECEDENTES NACIONALES

Pasco G, Sánchez F. (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%. (16)

Bautista R. (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 *Streptococo mutans*, la diferencia de promedios entre éstas cinco concentraciones mostró diferencia estadísticamente significativa. (17)

2.1.2 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

Cooper R, Molan C, Harding K. (1999) Evaluaron la actividad antibacteriana de la miel contra cepas de *Staphylococcus aureus* de heridas infectadas. Para la sensibilidad bacteriana de 58 cepas de *Staphylococcus aureus* coagulasa-positivo aislados de heridas infectadas utilizaron dos tipos de mieles, pasto miel y manuka a diferentes concentraciones. Las concentraciones inhibitorias fueron entre 2 y 3% (v / v) para la miel de manuka y entre 3 y 4% para la miel de pasto. Concluyeron que ambas mieles inhibían el crecimiento de *Staphylococcus aureus* según las concentraciones utilizadas en su estudio in vitro. (18)

Gamboa M, Figueroa J. (2009) Por Concentración Mínima Inhibitoria, mediante pruebas in vitro determinaron la capacidad antibacteriana, de 37 mieles de la especie *Tetragonisca angustula* de siete regiones de Colombia, con la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a tres especies de bacterias Gram positivas *Bacillus subtilis* sp. spizizenii; *Staphylococcus aureus* sp. aureus *Rosenbach* y *Micrococcus luteus* *Kocuria rhizophila* y tres Gram negativas *Salmonella enterica* sp. *enterica* serovar *Typhimurium*; *Escherichia coli*, y *Klebsiella pneumoniae* sp. La técnica CMI se evaluó en microdiluciones (v/v) al 90%, 45%, 22,5%, 12,3%, 5,6% de miel. Concluyeron que las mieles analizadas por prueba binomial presentaron efecto bactericida contra todas las cepas bacterianas del ensayo con mayor efectividad para *E. coli*, *M. luteus* y *S. entérica*, con una probabilidad de $p(x)=1$ a una dilución de 90%; al ser diluidas el mayor efecto se evidenció frente a *M. luteus* donde aún en dilución 5,6% presentaban probabilidades de $p(x)=0,62$ de actividad inhibitoria por parte de las mieles. En dilución de miel al 90%, el efecto fue solo cercano a $p(x)=0,5$ para *K. pneumoniae*, *B. subtilis* y *S. aureus*. (19)

Henriques A, Jenkins R, Burton N. (2011) Investigaron los efectos de manuka miel sobre la integridad estructural de *Pseudomonas aeruginosa*, la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) de manuka miel para *P. aeruginosa*. Se determinó el método mediante una microtitulación de la placa, y la supervivencia de las bacterias expuestas a una concentración bactericida de manuka miel. Los valores de MIC y MBC de manuka miel contra *P. aeruginosa* fueron 9,5% (w / v) y 12% (w / v), respectivamente; una curva de tiempo-kill demostró un efecto bactericida en vez de un efecto bacteriostático. Se concluyó que Manuka miel no induce los mismos cambios estructurales en *P. aeruginosa* como los observados en los estafilococos. En los resultados se observó que manuka miel tiene el potencial de ser un inhibidor eficaz de *P. aeruginosa*. (20)

Huttunen S, Riihinen K, Kauhanen J, et al. (2012) Analizaron la actividad antimicrobiana y los compuestos fenólicos de cinco productos de miel finlandeses contra los patógenos humanos importantes *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *S. aureus* resistentes a la meticilina. El método de dilución de microbrotes y HPLC-DAD se usó en ensayos antimicrobianos y determinación de compuestos fenólicos, respectivamente. Se encontró actividad antimicrobiana significativa ($p < 0.01$) contra todos los patógenos probados de hierba de sauce (*Epilobium angustifolium*), brezo (*Calluna vulgaris*) y alforfón (*Fagopyrum esculentum*) mieles. Es el primer informe sobre la actividad antimicrobiana de las mieles monoflorales finlandesas contra las bacterias estreptocócicas y estafilocócicas y hasta donde se sabe, este es también el primer informe sobre el efecto antimicrobiano de la miel contra *S. pneumoniae*. (21)

Becerra D, Cabrera J, Solano M. (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*. (22)

Carrión K. (2016) Evaluó el Efecto Antibacteriano in vitro de La Miel de Abeja de la Sierra y Costa Ecuatoriana Ante Cepas de *Streptococo mutans*, llegando a la conclusión que la miel de la sierra se muestra más efectiva en concentraciones al 50% y 80% con halos de inhibición de 9mm y 12.4mm respectivamente a diferencia de la miel de la costa que mostro efectividad solamente al 80% con halo de 9.6mm. (23)

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 *Streptococcus pneumoniae*

2.2.1.1 Morfología

1- El neumococo es un coco Gram positivo, que puede estar encapsulado o no. Esta especie bacteriana conforma colonias morfológicamente variables, con un diámetro de 0,5 a 1,2 μm ., de forma ovalada y dispuestas a manera de diplococos, vale decir en parejas. Conforme las colonias envejecen sus células se decoloran, pudiendo llegar a teñirse como Gram positivo. (24)

Las células del neumococo se disponen en parejas (diplococos) o en cadenas cortas. Encapsuladas conforman grandes colonias de entre 1 y 3 mm. de diámetro; en cambio las colonias de cepas no encapsuladas suelen ser pequeñas y aplanadas. La autólisis de las colonias, producto del paso de los años, se expresa a manera de una disolución de su zona central. (24)

En agar sangre se muestran como α -hemolíticas y al ser incubadas en medio aeróbico, y pueden llegar a ser β -hemolíticas bajo un medio anaeróbico. Su disposición α -hemolítico deviene de la neumolisina. Esta es una enzima que degrada la hemoglobina hasta adquirir una apariencia verdosa. (24)

En lo que a su nutrición se refiere, este microorganismo sólo desarrolla sus procesos metabólicos en presencia de medios sanguíneos. El *S. pneumoniae* logra la fermentación de carbohidratos, siendo el ácido láctico su principal

derivado. Asimismo se desarrolla con dificultad en medios de concentraciones elevadas de glucosa, sin que haya actividad enzimática de la catalasa. Ello, porque el ácido láctico producido alcanza prontamente valores lo suficientemente tóxicos para su metabolismo. (24)

Según Murray (24), las cepas virulentas de *S. pneumoniae* son observadas bajo el recubrimiento de una capa polisacárida de relativa complejidad. Actualmente han sido identificadas más de noventa serotipos diferentes de cepas y clasificadas mediante el uso de polisacáridos capsulares.

2.2.1.2 Clasificación taxonómica.

Al momento de su aislamiento, *S. pneumoniae* fue señalado por Pasteur y Sternberg, en 1881, como “microbio séptico de la saliva”. Cinco años después, Fraenkel lo denominó neumococo, en razón a la enfermedad pulmonar que producía. Posteriormente en 1929, Weichsenbaum le concedió el nombre científico de *Diplococcus pneumoniae*, en razón a su morfología. En términos actualizados, hoy es posible señalar a este patógeno como *Streptococcus pneumoniae*, ello a partir de la octava edición del Manual de bacteriología de Bergey del año 1974. (25)

Su clasificación taxonómica asumida en la actualidad corresponde al género *Streptococcus*, y a la familia Streptococcaceae. El género *Streptococcus* agrupa especies dentro del conjunto de los cocos Gram positivos, anaerobios facultativos, catalasa negativa y citocromo-oxidasa negativa. Los de importancia clínica son homofermentadores, pudiendo ser, a su vez, el producto final de la fermentación de la glucosa el ácido láctico. (25)

2.2.1.3 Factores de virulencia

La cápsula de polisacárido del microorganismo posibilita que la virulencia de *S. pneumoniae* logre resistir la opsonización, la fagocitosis y la destrucción intracelular de células fagocíticas. Este mecanismo es la base de su alto grado de virulencia. Hasta el momento se han caracterizado al menos noventa tipos capsulares de *S. pneumoniae*, siendo 23 de estos que representan un porcentaje

que excede el 88% de meningitis y bacteriemias, todas causadas por neumococos. (13)

Resulta importante señalar que algunos tipos llegan a ser más virulentos que otros. Ello ocurre, por ejemplo, con los encapsulados que provocan infecciones neumocócicas de tipo 3. En este caso, las propiedades biológicas de la cepa lo hacen bastante más virulento que otras. Del mismo modo, los diferentes serotipos capsulares existentes muestran una alta tasa de variabilidad en su capacidad para producir respuestas de anticuerpos humorales. (13)

Finalmente resulta importante señalar que existen productos celulares de *S. pneumoniae* de tipo enzimático como la autolisina y la neumolisina, así como diversas otras moléculas de la superficie celular, que pueden desempeñar un rol importante en la virulencia de neumococos. (13)

2.2.1.4 Patogénesis

El pulmón está constantemente expuesto a un medio de constante intercambio gaseoso con otros microorganismos, así como con diversas partículas inhaladas con el aire inspirado.

Si bien las vías respiratorias bajas han sido tradicionalmente entendidas como estériles, estudios recientes mediante técnicas no dependientes del cultivo dan cuenta de una equivalente microflora en las vías respiratorias altas y bajas en personas sanas pero con menor presencia de microorganismos, en el pulmón. (26)

De presentarse un defecto en las defensas del huésped podrán asumirse problemas en el sistema de defensa, una sobreexposición al patógeno o una inoculación sumamente intensa. En un caso así, una aspiración de microorganismos infecciosos por parte del paciente habrá llegado a sus vías respiratorias inferiores procedentes de vías respiratorias superiores, de la inhalación de una suspensión en aerosol o, con escasa probabilidad, de una diseminación metastásica pulmonar de vía hematológica. (26)

2.2.1.5 Defensas del hospedero.

La mayoría de las bacterias mide 0,5-2 μm . Estas dimensiones les permiten lograr alcanzar vías respiratorias terminales, e incluso los alveolos. Lamentablemente y a esta altura, no existe un sistema mucociliar, por lo que de llegar allí el patógeno, la infección es lamentablemente asegurada (26). Sin embargo en las vías superiores y puntos de ingreso, existen diversos mecanismos que, como barreras anatómicas y fisiológicas, combaten fuerte en contra de la enfermedad. (26)

Existe, en todo sistema de defensa pulmonar, un mecanismo de inmunidad innata y otro adaptativo. Este se conforma de barreras anatómicas y mecánicas, de una inmunidad humoral, una inmunidad celular y de acciones de fagocitosis. (26)

Las vías respiratorias superiores (la nasofaringe, la orofaringe y la laringe), dan inicio a un camino morfológico en la exposición al patógeno, el mismo que se presenta en forma de microorganismos en busca de inhalación. (26)

La mucosa nasal, conteniendo epitelio ciliado y tejido productor de moco, constituyen la primera de las barreras anatómicas. Los microorganismos que allí son atrapados logran ser expulsados mediante los consabidos medios mecánicos de expulsión y/o deglución, a través de la nasofaringe. Como factores importantes en este primer momento de defensa mecánico a nivel de la orofaringe, tenemos al flujo de saliva, la descamación de las células epiteliales, la producción de complemento local y la interferencia bacteriana con la flora residente.

Una adherencia de los microorganismos al epitelio en las vías respiratorias superiores constituye un paso inicial crítico para una colonización y una subsecuente infección. (26)

El 10% de las proteínas totales de las secreciones nasales corresponden a la inmunoglobulina A (IgA). Esta es la principal inmunoglobulina producida en las vías respiratorias superiores como medio de defensa. A pesar de tratarse de una opsonina, muestra escasa actividad antibacteriana y antiviral, siendo por ello poco eficaz. (26)

2.2.1.6 Epidemiología

Existe un vínculo comprobado entre la colonización de *S. pneumoniae* y las poblaciones infantil y adulto mayor. Este puede iniciarse desde los seis meses de edad, lo que la colonización llega a ser más frecuente en niños que en adultos. De ello es posible comprender por qué el proceso llega a ser frecuente entre adultos que conviven con niños afectados. (24)

Posteriormente, el niño llega a ser colonizado transitoriamente por otros serotipos del patógeno. A pesar de que los nuevos serotipos se adquieren en cualquier época del año, la mayor incidencia se produce durante los meses fríos. (24)

La mayor incidencia en niños y en adultos mayores se explica, como razón fundamental, en las concentraciones bajas de anticuerpos protectores que estas presentan, frente a los polisacáridos capsulares neumocócicos. (24)

La diseminación de cualquier enfermedad neumocócica se produce cuando los microorganismos que colonizan la nasofaringe y la bucofaringe consiguen ubicaciones anatómicas lo más alejado posible de sus zonas de ingreso. Así, el patógeno puede alcanzar los pulmones (produciendo neumonía); los senos paranasales (produciendo sinusitis); los oídos (produciendo otitis media) y las meninges (produciendo meningitis). A partir de las nuevas ubicaciones y una vez consolidado, el patógeno puede diseminarse por vía hematógica al resto del organismo. (24)

La neumonía se produce cuando los microorganismos endógenos bucales logran ser aspirados hacia las vías respiratorias inferiores. Asimismo, las cepas llegan a ser propagadas de una persona a otra en una población cerrada mediante las gotitas respiratorias presentes en el aire. Para las enfermedades neumocócicas las epidemias llegan a ser poco frecuentes. (24)

Murray (24), señala como proceso de contagio un proceso que incluye: una elusión de los mecanismos de defensa, los mismos que corresponden a: un reflejo de la epiglotis; una inmovilización de las bacterias por las células productoras de mucosidad que tapizan el bronquio; una eliminación de los microorganismos por las células del epitelio ciliado; y un acto reflejo conocido

como tos. Sólo una evasión de estas barreras hace que el microorganismo colonizador alcance la bucofaringe y consiga un acceso a los pulmones.

2.2.1.7 Importancia Clínica

S. pneumoniae es la primera causa principal de neumonía bacteriana extrahospitalaria.

En lo que a un contagio a nivel de vías respiratorias altas se refiere, ello se produce alcanzando un orden entre 5-10% en los adultos. En poblaciones consideradas como cerradas, se han reportado tasas de portantes mayores al 60%. (13)

En lo que a poblaciones de menores edades se refiere, los lactantes son colonizados por primera vez alrededor de los tres a cuatro meses de edad. Cuando ello ocurre se mantienen en dicha situación durante unos cuatro meses con un serotipo específico. La incidencia máxima de colonización neumocócica ocurre a entre los dos y tres años; en cuyo caso la tasa excede rangos entre un 40 y un 60%. La colonización en lactantes con neumococos se relaciona con una ausencia de anticuerpos anticapsulares específicos, así como de los serotipos poco antigénicos que son frecuentes en este grupo etario. El grado de susceptibilidad en ancianos se produce debido a que toda enfermedad neumocócica hace aflorar qué tan envejecido se halla el sistema inmunitario, así como su producción de anticuerpos. Importante son, asimismo, cambios generales en los niveles de actividad física, los mecanismos de depuración mucociliar, la desnutrición o el debilitamiento debido a dolencias crónicas subyacentes como la diabetes o alcoholismo. Los serotipos estadísticamente más asociados a la población infantil están asociados a los serotipos: 6, 14, 18, 19 y 23. La mayoría de las infecciones graves por *S. pneumoniae* ocurren entre lactantes menores a los 3 años, y mayores de 65 años. (13)

S. pneumoniae accede a los espacios alveolares mediante un mecanismo de aspiración o inhalación y finalmente puede producir neumonía lobular, con consolidación y bacteriemia. En los niños mayores y los adultos jóvenes, los síntomas incluyen escalofríos, seguidos de fiebre sostenida, tos y producción de esputo purulento y a menudo hemoptoico. En la población pediátrica, *S.*

pneumoniae representa el 40-50% de los casos de otitis media aguda y se ha asociado con sinusitis y mastoiditis. (13)

Si bien una dolencia respiratoria previa es un condicionante para su predisposición, el inicio de una neumonía es casi siempre brusco. Las complicaciones en toda neumonía neumocócica corresponden a: absceso pulmonar, infecciones pericárdicas, empiema, derrames pleurales y endocarditis. (13)

Una preocupación importante con respecto a *S. pneumoniae* la constituye la aparición de resistencia a los antibióticos, sobre todo a la penicilina. Los primeros registros de resistencia disminuida a la penicilina fueron reportados inicialmente en la década de 1960. (13)

2.2.2 PRODUCTOS DE LA COLMENA

Gracias a las abejas, el hombre puede obtener diversos productos de la colmena, entre estos se tiene: miel, polen, propóleos, cera, jalea real, toxinas, etc. (27)

2.2.2.1 Miel de Abeja

La principal fuente de origen de la miel es el néctar, sustancia segregada por los nectarios florales en la cual el azúcar que usualmente predomina es la sacarosa. Las abejas obreras succionan el néctar de las flores y lo almacenan temporalmente en su buche melario. Al regresar a su colmena depositan en una celda del panal junto con saliva que contiene la enzima invertasa que transforma la sacarosa del néctar en glucosa y fructosa. Paralelo a esto, pierde agua, obteniéndose así la miel madura en celdas que las obreras cierran u operculan con una fina capa de cera. (27)

2.2.2.2 Polinización: El transporte del polen de las anteras al estigma de la flor se llama polinización. Este traslado se lleva a cabo por diversos medios como son el viento, el agua, la gravedad, los colibríes y por supuesto los insectos. (28) Las abejas melíferas son los más eficientes polinizadores, pues visitan muchas flores de la misma especie en sucesión, se mueven frecuentemente de una flor a otra, llenan sus cuerpos peludos de polen y lo llevan a otras flores efectuando así una transferencia muy efectiva. (28)

2.2.2.3 Recolección o cosecha de Miel de Abeja

a) Selección de los marcos con miel: Se debe seleccionar los panales que tengan miel madura, es decir solo se deben cosechar los panales operculados (sellados con cera), ya que la miel que está en las celdas no operculadas es miel inmadura o verde, el cosechar esta miel significa un riesgo por la proliferación de bacterias y/o levaduras que fermenten el producto. (29)

b) Área de cosecha: La cosecha de la miel se realiza en un área cerrada. Esta área garantiza un aislamiento con el ambiente, previniendo la entrada de abejas, plagas y roedores, con una protección adecuada contra el polvo y permitir una limpieza correcta. (30)

c) Des operculado: Para realizar la cosecha es necesario desalojar las abejas de los panales con miel utilizando el cepillo sin utilizar repelentes o sustancias químicas, ya que se estaría contaminando la miel. Los panales descubiertos deben cargarse en la centrífuga, es necesario equilibrar los pesos, así al mover el extractor saldrá la miel sin dificultad y sin dañar los panales. La miel de los opérculos para que mantenga su calidad deberá obtenerse por gravedad (escurrida) o centrifugación. (30)

d) Almacenamiento de la miel: Las condiciones de almacenamiento son un punto crítico en la cadena producción, proceso, envasado y comercialización de la miel. Si no se cuenta con un área protegido del sol y la lluvia; la miel envasada sufrirá modificaciones físicas y químicas que afectarán negativamente su calidad. La acción del sol eleva los valores de Hidroximetilfurfural y disminuye la actividad diastásica de la miel. (29)

2.2.2.4 Métodos de Cosecha de la Miel

a) Miel escurrida: Es la miel obtenida por escurrimiento de los panales desoperculados, sin larvas.

b) Miel prensada: Es la miel obtenida por prensado de los panales sin larvas.

c) Miel centrifugada: Es la miel obtenida por centrifugación de los panales desoperculados, sin larvas.

d) Miel filtrada: Es la que ha sido sometida a un proceso de filtración sin alterar su valor nutritivo. (30)

2.2.2.5 Clasificación

Por su origen botánico

a) Miel de Flores: es la obtenida principalmente de los néctares de las flores y se distinguen:

- Mieles uniflorales o monoflorales.
- Mieles multiflorales, poliflorales, mil flores o cien flores

b) Miel de mielato: es la obtenida primordialmente a partir de secreciones de las partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que se encuentran sobre ellas. (31)

2.2.2.6 Control de Calidad

Según la Norma del Codex para la Miel - Codex Stan 12-1981, Rev. 1 (1987) el cual es una colección reconocida internacionalmente de estándares, códigos de prácticas, guías y otras recomendaciones relativas a los alimentos, se entiende por miel, a la sustancia dulce natural producida por abejas (*Apis mellifera*) a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de éstas que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias propias que luego depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure y añeje. (32)

La miel debe de tener los siguientes factores de composición y calidad según el Codex y la Norma Técnica Peruana para la Miel.

2.2.2.7 Características Organolépticas

a) **Color:** desde clara hasta oscura, pasando por varias tonalidades del amarillo y del ámbar, pero siendo uniforme en todo el volumen del envase que la contenga.

b) **Sabor:** característico a su origen o procedencia botánica.

c) **Olor:** característico a su origen o procedencia botánica.

d) **Consistencia:** fluida, viscosa o cristalizada total o parcialmente. (31)

2.2.2.8 Identificación de Metabolitos primarios y secundarios

Tabla N° 1 Identificación de metabolitos primarios de dos muestras de miel de abeja en dos departamentos del Perú. (33)

Técnica de Identificación	Metabolitos Primarios	Miel de Abeja	
		M _A	M _B
<i>Reacción de Fehling</i>	<i>Azucares Reductores</i>	++	+
<i>Reacción de Bial</i>	<i>Pentosas</i>	++	+
<i>Reacción de Bertrand</i>	<i>Pentosas</i>	++	+
<i>Reacción de Selivanoff</i>	<i>Cetosas</i>	++	+
<i>Reacción de Berg</i>	<i>Aldosas</i>	+	+

M_A : Miel de abeja obtenida del distrito de Shirac, provincia de San Marcos, departamento de Cajamarca; recolectada en el mes de Julio - 2004.

M_B : Miel de abeja obtenida del distrito de Pampas de Hospital, provincia de Tumbes, departamento de Tumbes; recolectada en el mes de Junio del 2005.

- : NEGATIVO

+ : POSITIVO (Presencia de metabolitos primarios)

++ : POSITIVO (Marcada presencia de metabolitos primarios)

Tabla N°2 Identificación de metabolitos secundarios de dos muestras de miel de abeja en dos departamentos del Perú.

Extractos	Constituyentes	Miel de Abeja	
		M _A	M _B
Diclorometánico	Esteroides	+	+
	Quinonas	-	-
Metanólico	Esteroides	+	+
	Alcaloides	-	-
	Flavonoides	+	+
	Taninos	-	-
Acuoso-Ácido	Hidroxiilos fenólicos	-	-
	Alcaloides	-	-
	Taninos	-	-
Acuoso	Alcaloides	-	-
	Flavonoides	+	+
	Taninos	-	-
	Leucoantocianidinas	+	+
	Saponinas	-	-
	Hidroxiilos fenólicos	-	-

LEYENDA: Presencia (+)
No Presencia (-)

2.2.2.9 Características Físico-químicas

Características Químicas: La composición química de la miel permite evaluar su calidad con base en su contenido de agua, azúcares, acidez, cenizas, enzimas, nitrógeno, hidroximetilfurfural y sustancias insolubles. (34)

a) Humedad: El contenido de agua de las mieles determina su grado de conservación. Cuando la miel es almacenada a bajas temperaturas y en un ambiente húmedo, absorbe humedad y se diluye, lo cual provoca su fermentación. En caso contrario, cuando se almacena en un ambiente con poca humedad, la miel pierde agua, de modo que su cuerpo se vuelve más espeso. La cosecha de mieles no operculadas o inmaduras también ocasiona una humedad elevada en este producto, cuyo mayor inconveniente es el aumento en el riesgo de fermentación. (34)

b) Azúcares: Los azúcares constituyen prácticamente 80% del peso seco de cualquier miel y por ello determinan altamente muchas de sus características como higroscopicidad, viscosidad y baja Aw. (34)

c) Acidez: La acidez de la miel se debe a la presencia de ácidos en equilibrio con sus lactonas y algunos iones inorgánicos. La acidez total es la suma de acidez libre y lactona. (35) Suele ser más elevada en mieles fermentadas. (34)

d) pH: El bajo pH de la miel inhibe el crecimiento de microorganismos. El pH se mide directamente en una solución de agua de la miel. Por lo general, la solución de miel consiste de 10 g de miel en 100 ml de agua o 10 g de miel en 75 ml de agua. (35)

e) Cenizas: Expresa el contenido de sales minerales y suele ser proporcional al tono de la miel, mieles más oscuras poseen un mayor contenido de minerales y viceversa. (34)

f) Enzimas: Las mieles son ricas en enzimas. Una de las enzimas de mayor interés en la miel es la diastasa que tiene la facultad de escindir el almidón en glucosa, es muy termolábil por lo que su ausencia indica calentamiento y/o envejecimiento de la miel. (34)

g) Nitrógeno: El contenido de compuestos nitrogenados como proteínas y aminoácidos en la miel es muy bajo y se asocia con la presencia de granos de polen. (34)

h) Hidroximetilfurfural (HMF): El contenido de HMF es un indicador de la frescura de la miel, que es un criterio importante para la evaluación del daño por calor y / o envejecimiento del producto. (35)

Es un compuesto que se forma por descomposición de la fructosa ante la existencia de ácidos, su presencia en la miel puede aumentar por exposición de ésta a altas temperaturas. (34)

Características físicas: La viscosidad y el color de la miel son sus características físicas más estudiadas

a) Color: Es una propiedad óptica de la miel que resulta de los diversos grados de absorción de luz de ciertos pigmentos y otras sustancias desconocidas que se encuentran en la miel. (34)

b) Cristalización: Es un estado natural de las mieles que se presenta cuando los azúcares de la miel que se encuentran en exceso son liberados en forma de cristales, en algunos casos este proceso depende no solo del origen floral, sino también de las condiciones de procesamiento y almacenamiento. (34)

c) Índice de refracción: Permite determinar de manera rápida y precisa la humedad de la miel. (34)

d) Viscosidad: La miel en estado líquido suele ser muy viscosa, esta propiedad depende de su composición química, contenido de agua y temperatura. Una baja viscosidad en la miel puede ser un indicador de adulteración por adición de agua. (34)

e) Densidad: La densidad se expresa como gravedad específica, y los valores están relacionados con el contenido de agua, la temperatura y la concentración de sólidos. La densidad disminuye linealmente mientras la temperatura o el contenido de agua aumenta, y aumenta linealmente con un aumento del contenido de sólidos. (35)

f) Conductividad eléctrica: Depende del contenido de sales y sirve para diferenciar la miel de néctar de la miel de mielada que es más rica en sales. (34)

g) Higroscopicidad: Se relaciona con la humedad. (34)

h) Rotación óptica: Este parámetro también se utiliza para diferenciar la miel de néctar (suele ser levógira) de la miel de mielada (suele ser dextrógira). (34)

Tabla Nº 3. Estándares Fisicoquímicos del Codex alimentario y Unión Europea

Parámetro	Codex	EU
Humedad	≤ 20g/100g	≤ 20g/100g
Sólidos insolubles	≤ 0.1g/100g	≤ 0.1g/100g
Acidez libre	≤ 50 meq/Kg	≤ 40 meq/Kg
Conductividad eléctrica	≤ 0.8mS/cm	≤ 0.8mS/cm
Cenizas	≤ 0.6g/100g	≤ 0.6g/100g
HMF	≤ 60mg/Kg	≤ 40mg/Kg
Sacarosa	≤ 5g/100g	≤ 5g/100g
Fructosa Glucosa Maltosa	≥ 60g/100g (Sumatoria de azúcares reductores)	≥ 60g/100g (Sumatoria de azúcares reductores)

Fuente: Madariaga, P. 2005

Tabla Nº 4. Otros estándares Fisicoquímicos

Parámetro	Estándares
Color	0-150 mm Pfund ^a
Viscosidad	4.8 Pas.a 25° C con 18.2 % de humedad
a _w	0.55 -0.60
Sólidos solubles totales	> 78g/ 100g
pH	3.5-4.5 Floral ^b 4.5 -5.5 Mielada ^b

^a USDA (1985), ^b IRAM (1995- 1996)

Fuente: Madariaga, P. 2005

2.2.2.10 Parámetros microbiológicos según el MINSA

Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano, mediante Resolución Ministerial N° 591-2008-MINSA-27/06/2008. (36)

Tabla N° 5 Requerimientos microbiológicos en miel, jalea real y productos similares.

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g.	
					m	M
Aerobios mesofilos	2	3	5	2	10^3	10^4
Anaerobios sulfito reductores	5	3	5	2	10^2	10^3
Mohos	2	3	5	2	10	10^2

Fuente: Resolución Ministerial N° 591-2008-MINSA-27/06/2008.

Donde: Categoría: Es el grado de riesgo que representan los microorganismos en relación a las condiciones previsibles de manipulación y consumo del alimento.

n: Es el número de unidades de muestra seleccionadas al azar de un lote, que se analizan para satisfacer los requerimientos de un determinado plan de muestreo.

c: Número máximo permitido de unidades de muestra rechazables en un plan de muestreo de 2 clases o número máximo de unidades de muestra que puede contener un número de microorganismos comprendidos entre “m” y “M” en un plan de muestreo de 3 clases. Cuando se detecte un número de unidades de muestra mayor a “C” se rechaza el lote.

m: Límite microbiológico que separa la calidad aceptable de la rechazable. En general, un valor igual o menor a “m” representa un producto aceptable y los valores superiores a “m” indican lotes aceptables o inaceptables.

M: Los valores de recuentos microbianos superiores a “M” son inaceptables, el alimento representa un riesgo para la salud. (36)

2.2.2.11 Composición nutricional de la miel de Abeja

Tabla Nº 6

Componente	Rango
Humedad	14 – 20 %
Carbohidratos (totales)	82-95%
Fructosa	28-44%
Glucosa	22-38%
Sacarosa	0,2-5%
Maltosa	2-16%
Otros azúcares	0,1-8%
Proteínas y aminoácidos	0,2 -2%
Grasas	0
Colesterol	0
Energía	304 kcal
Vitaminas	
Tiamina	<0,0 mg
Riboflavina	<0,06 mg
Niacina	<0,36 mg
Ácido pantoténico	<0,11 mg
Piridoxina (B6)	<0,32 mg
Ácido ascórbico	2,2 – 2,4 mg
Minerales	
Calcio	4,4 – 9,2 mg
Cobre	0,003 – 0,1 mg
Hierro	0,06 – 1,5 mg
Magnesio	1,2 – 3,5 mg
Manganeso	0,02 – 0,4 mg
Fósforo	1,9 – 6,3 mg
Potasio	13,2 – 16,8 mg
Sodio	0 – 7,6 mg
Zinc	0,03 – 0,4 mg
Cenizas	0,2 – 1 %

Fuente: Norma Mexicana NMX-F-036-1997-NORMEX ⁽³⁴⁾

2.2.2.12 Actividad biológica

Compuestos fenólicos: Son contribuyentes importantes de la capacidad antioxidante de la miel. Dado que la composición de los fenólicos es muy variable con respecto al origen floral, se espera que la miel de abeja muestre una amplia gama de poder antioxidante. (37)

Flavonoides: Se ha recogido evidencia que los flavonoides como la quercetina, kaempferol, crisina, galangina y apigenina pueden estar implicados en la actividad de la miel contra *C. albicans*. (37)

Péptidos: Los péptidos de *Ziziphus* sp miel con masas moleculares han demostrado actividad antiprotzoal contra el parásito intestinal *Giardia lamblia*. Además, tres diferentes mieles de *Plectranthus*, *Ziziphus* y acacia, también ha demostrado poseer actividad nematocida contra *Caenorhabditis elegans*, que se ha correlacionado con la presencia de un Gluco conjugado no identificado. (37)

Fructuosa: La fructosa es un agente antidiabético potencial, la mezcla equilibrada de fructosa y glucosa podría jugar un papel adicional en este tipo de efecto ya que los dos azúcares son conocidos por actuar sinérgicamente en la promoción de la glucosa hepática.

Se ha encontrado que la miel reduce la glucosa en la sangre en modelos animales y en pacientes con alteración de la tolerancia a la glucosa o diabetes, aunque los estudios clínicos no han proporcionado pruebas concluyentes. (37)

Polifenoles: Los efectos inhibitorios de la miel sobre diversos tipos de cáncer han sido estudiados tanto in vitro como en modelos animales. Se sabe que los polifenoles poseen propiedades quimiopreventivas y en consecuencia, se ha demostrado que la miel con mayor carga fenólica es más potente en la inhibición y proliferación de células cancerosas. (37)

2.2.2.13 Actividad Antibacteriana de la miel

Efecto osmótico

La miel es una solución super saturada de azúcares, es en parte responsable de sus efectos de antibiosis por mecanismos físicos como es la deshidratación de la célula bacteriana e inhibición de la división celular. (33).

El alto contenido de azúcar de la miel hace que el agua no esté disponible para los microorganismos, ninguna bacteria u hongo puede crecer en la miel completamente madura. El contenido de agua por lo general sólo es de 15-21% de los sólidos en la miel, el 84% es una mezcla de los monosacáridos fructosa y glucosa. La fuerte interacción de estas moléculas de azúcar con moléculas de agua deja muy pocas moléculas de agua disponibles para los microorganismos. La actividad del agua (a_w) de miel madura es demasiado bajo para soportar el crecimiento de cualquier especie, no se produce fermentación si el contenido de agua es inferior al 17,1% la inhibición por el efecto osmótico (agua) de soluciones diluidas de miel depende obviamente de las especies de bacterias. (3)

Acidez

El pH de la miel es característicamente bastante ácido, está entre 3,2 y 4,5. La acidez de la miel es lo suficientemente baja como para relentizar o prevenir el crecimiento de muchas especies de bacterias, pero esta acidez puede ser neutralizada si la miel se diluye con soluciones amortiguadoras tales como fluidos corporales. Esta acidez se debe principalmente al contenido de gluconolactona / ácido glucónico presente como resultado de la acción enzimática en el néctar de maduración, con valores medios de 0,23-0,98%. (3)

La acidez es un factor que inhibe el crecimiento bacteriano, su pobre contenido en proteínas privan del nitrógeno que necesitan las bacterias para crecer, hacen de la miel una barrera contra infecciones (33)

Peróxido de hidrógeno

La enzima glucosa oxidasa activada por diluciones de miel genera peróxido de hidrógeno que generalmente es el principal factor antibacteriano en la miel. Esta enzima se inactiva calentando la miel y exponiéndola a la luz en algunas mieles que contienen un factor sensibilizante. Algunas mieles también contienen sustancias que destruyen el peróxido de hidrógeno generado por la enzima.

La tasa de producción de peróxido de hidrógeno disminuye agudamente cuando se reduce el nivel de glucosa, como sucedería cuando la miel se diluye mucho. Esto causa una complicación en la interpretación del número de inhibina como medida de la actividad antibacteriana. (3)

La cantidad de peróxido de hidrógeno producido en miel diluida es claramente lo suficientemente alta para dar una actividad antibacteriana sustancial. Es posible que el peróxido de hidrógeno tenga un potencial aún mayor para inhibir las bacterias en la miel que cuando se prueba por sí mismo. La acción bactericida del peróxido de hidrógeno puede ser potenciada por el ácido ascórbico (vitamina C), se observó un poderoso efecto bactericida. (3)

Cuando la miel de abejas es aplicada sobre una herida la enzima Glucosa oxidasa produce a nivel local una liberación lenta de peróxido de hidrógeno. (33)

En la miel de abeja, uno de los componentes, el metil-glioxal, se considera altamente citotóxico bacteriano, y trabaja sinérgicamente con otros componentes de la miel para producir acción bactericida eficaz (37) (38)

2.2.2.14 Factores Involucrados en la pérdida de la actividad Antibacteriana

Las mieles proporcionadas para uso terapéutico deben analizarse para determinar su actividad antibacteriana como una forma de control de calidad.

Pasteurización

La miel a menudo se pasteuriza, a una temperatura de 70-75 ° C, para destruir las levaduras que pueden echar a perder una miel con un alto contenido de agua, o para disolver los cristales de azúcar que podrían iniciar la granulación en una miel líquida. En vista de la corta vida media de la actividad antibacteriana en las

temperaturas de pasteurización, está claro que la pasteurización de la miel es indeseable si la miel se va a usar como antiséptico. También sería aconsejable mantener cualquier otro calentamiento de la miel durante el procesamiento y almacenarlo a temperaturas frescas. (3)

Filtración

Cuando la miel se filtra para eliminar el polen y otras partículas que pueden iniciar la granulación, se ha descubierto que la glucosa oxidasa se adsorbe en las almohadillas filtrantes en la filtración Seitz. Queda por determinarse si la enzima se elimina por absorción a las ayudas de filtración utilizadas en la clarificación de las mieles líquidas. (3)

Exposición a la luz

El peróxido de hidrogeno y la actividad antibacteriana de la miel son destruidos por la exposición a la luz. Debido a que hay poca certeza acerca de qué fuentes florales dan mieles que son sensibles a la luz, y porque algunas pueden ser muy sensibles, es importante que la miel destinada para uso terapéutico esté protegida de la luz para evitar la posible reducción de su actividad antibacteriana. (3)

2.2.2.15 La miel y su uso en medicina

La miel es un jarabe nutritivo rico en hidratos de carbono rico, que se utilizó eficazmente desde tiempos antiguos en la medicina tradicional. Diferentes estudios han demostrado que la miel tiene efecto antimicrobiano, efecto antiinflamatorio, efecto antioxidante, antiparasitario, potenciación del sistema inmune y tiene eficacia demostrada contra las infecciones del tracto respiratorio. (39)

La miel tiene la capacidad de estimular los monocitos humanos para producir citoquina. Recientemente, la miel mostró actividad antineoplásica utilizando un modelo inducido de cáncer de vejiga. (40)

El uso de miel en el tratamiento de quemaduras tiene la ventaja de crear un ambiente húmedo, que ahorra la integridad de la superficie de la quemadura, ya que no es adherente, proporciona una barrera bacteriana que previene la infección cruzada y previene la infección de las bacterias. (40)

La miel tiene propiedades antiinflamatorias, ya que debrida la herida, inhibe la cicatrización y también estimula la cicatrización de las heridas al estimular la regeneración de los tejidos, además de reducir la necesidad de injertos de piel. No hay efectos adversos por el uso de miel en la curación de quemaduras.

Muchos informes tratan las propiedades antibacterianas de la miel contra una amplia variedad de microbios que acelera el proceso de cicatrización de heridas. (40)

Su actividad antimicrobiana ha sido confirmado por numerosos autores, en bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus luteus*, etc) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae*, etc. (41)

2.2.2.16 Efectos adversos

La miel no debería ser un producto completamente seguro porque puede contener varios compuestos tóxicos que pueden tener efectos adversos en la salud humana. Algunos de estos compuestos pueden originarse debido al proceso de calentamiento, almacenamiento deficiente, manejo deficiente y alta humedad. Además, los néctares recolectados de plantas tóxicas y de áreas que contienen sustancias metálicas peligrosas pueden ser una fuente de estos compuestos tóxicos.

Las toxinas que se encuentran en la miel pueden incluir pirrolizidina alcaloides, GTX, hiosciamina, hioscina, saponina, estricnina, gelsemine, tutin, hyenanchin, oleandrin y oleandrogenin. La miel contiene metales pesados potencialmente tóxicos (como Co, Cr, Ni, Se, As, Cd, Hg y Pb), que pueden estar presentes debido a contaminación ambiental. (42)

El uso de productos herbarios que contienen alcaloides de pirrolizidina está específicamente prohibido por las mujeres embarazadas y lactantes porque los fetos y los bebés son particularmente susceptible a envenenamiento por alcaloides de pirrolizidina ya que altos niveles de alcaloides pirrolizidínicos presentes en algunas mieles puede ser capaz de causar toxicidad crónica progresiva, especialmente en bebés y fetos. (43) (42)

La anafilaxia a los productos de las abejas es rara, los episodios han sido asociados a los componentes de la abeja en sí, a los componentes del veneno de la abeja. Sin embargo, hay una proporción de pacientes (alrededor del 9%) que podría ser alérgico exclusivamente a proteínas específicas de un tipo de miel que les permite consumir otros tipos de miel. (44)

2.2.2.17 Síntomas de Alergia a la Miel

Los síntomas varían desde picazón en la boca (52%), urticaria de contacto y angioedema (9%), síntomas gastrointestinales (17%) y exacerbación de asma bronquial (30%) a anafilaxia (17%). Treinta por ciento de los pacientes alérgicos a miel muestran anticuerpos contra el veneno de abeja, pero también el veneno de himenópteros puede demostrarse alrededor del 20% de la población general (44)

2.2.3 RINCONADA ALTA

Rinconada Alta es un centro poblado que se encuentra ubicado en el distrito de Lurín, este valle aún conserva extensas áreas agrícolas como árboles de manzano, ciruelo, higo, eucalipto etc. y diversa variedad de flora silvestre, habitat ideal para que las abejas puedan elaborar una miel de alta calidad. La miel utilizada para nuestra tesis fue cosechada y adquirida del centro Apicultor “Rinconada Alta” en el mes de septiembre ya que hay mayor abundancia de flora y se puede obtener una miel de tipo multifloral.

2.3 FORMULACION DE HIPÓTESIS

2.3.1. HIPÓTESIS GENERAL

La miel de abeja "*Apis mellifera*" tiene efecto antibacteriano *in vitro* frente a la cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

2.3.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- 1- La concentración de la miel de abeja al 25% tiene efecto antibacteriano frente a la cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.
- 2- La concentración de la miel de abeja al 50% tiene efecto antibacteriano frente a la cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.
- 3- La concentración de la miel de abeja al 75% tiene efecto antibacteriano frente a la cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

2.4 Variables

2.4.1 Tabla de Operacionalización de Variables

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Tipo de Variable		Escala
				Según su naturaleza	Según su función	
V. I.: Miel de abeja “apis mellifera”	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.(códex)	Se medirá según la designación de la concentración utilizada.	Concentracion es al: 25 % 50% 75%	Cuantitativa	Independiente	De Razón
V. D.: Efecto antibacteriano frente a <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	Capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano de: <i>Streptococcus pneumoniae</i> (ATCC 49619) debido a la presencia de miel de abeja.	Presencia e Intensidad	Medición de halos de inhibición expresada en (mm)	Cuantitativo	Dependiente	Duraffourd

2.5 DEFINICION DE TERMINOS BASICOS

Streptococcus pneumoniae.- Es un agente común de las enfermedades respiratorias bajas y altas, tales como neumonía y otitis media aguda (infecciones del oído medio), y de meningitis, que afectan a los niños y los adultos en todo el mundo. (45)

Miel de Abeja.- La miel es una sustancia dulce y viscosa que producen las abejas a partir del néctar de las flores, exudaciones de otras partes vivas (mielato) o de la excreción de insectos, y que estas recogen, transforman, combinan y almacenan en los panales. (46)

Efecto Antibacteriano *in vitro*.- Es un proceso por el cual se puede medir la actividad antimicrobiana *in vitro* para establecer, la potencia de un antimicrobiano en solución y la sensibilidad de determinado microorganismo a una concentración conocida del fármaco. (47)

Halo de inhibición.- Zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma en el que no hay crecimiento bacteriano en una placa con agar inoculada con la bacteria, se mide la potencia del antibiótico frente a la bacteria. (48)

ATCC.- (American Type Culture Collection) marca registrada de la colección de cultivos de tipo americano. (45)

Escala de Mc. Farland.- Estándar de turbidez de sulfato de bario. La escala usada para el inóculo de las pruebas de susceptibilidad por el método de disco difusión es 0.5. (49)

Cepa.- Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento. (49)

Hidroximetilfurfural.- Compuesto químico (aldehído cíclico –C₆H₆O₃-), que se produce por degradación de los azúcares, principalmente a partir de la deshidratación de la fructosa y de la glucosa en medio ácido, sobre todo si se eleva la temperatura. (30)

CAPITULO III: METODOLOGIA

3.1 TIPO Y NIVEL DE LA INVESTIGACION

Estudio experimental *in vitro*

La investigación realizada es de tipo “experimental”, porque se controlara la acción de una variable sobre otra. Para ello, se manipulo de manera intencionada la variable independiente para luego analizar las consecuencias de manipulación que se generarán en la variable dependiente. Además, será muy importante y obligatorio controlar las variables intervinientes de manera rigurosa para saber de qué forma o debido a qué se produce una situación o acontecimiento particular.

3.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACION

Este es un estudio experimental *in vitro*, donde se evaluó el efecto de la variable de la miel de abeja a diferentes concentraciones frente a un inóculo determinado de la bacteria. Se usó un control negativo para determinar presencia de contaminantes en la miel de abeja. Los procedimientos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología (Laboratorio 5) de la Subunidad de Investigación e Innovación Tecnológica del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja.

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA DE LA INVESTIGACION

3.3.1 POBLACIÓN

Miel de abeja multiflora del centro apicultor "Rinconada Alta" localizado en el distrito de Lurín (Departamento de Lima) Latitud 12°16'07" y Longitud Oeste 76°53'05"

3.3.2 MUESTRA

100 gr. De miel de abeja de origen multiflora primaveral.

3.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Se elaboró una ficha de recolección de datos la cual es creada para recolectar los datos de los resultados observados durante todo el proceso en el laboratorio (ver ficha, Anexo 3).

- Promedio de halos de inhibición expresada en milímetros (mm).

3.5 TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

3.5.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

A) Control de Calidad

Según la Norma AOAC, Official Methods of Analysis International donde se indica sus características organolépticas y fisicoquímicas. (50)

- Análisis organoléptico

Aspecto : viscoso
Color : Blanco Extra 9.7mm (Escala de Pfund)
Olor : sui-géneris
Sabor : dulce

- **Análisis físico - químico**

a) Acidez

Pesar la miel (5g) y disolverla en 25ml de agua destilada.

Titular la muestra de ensayo con solución de hidróxido de sodio 0.1N libre de carbonatos, utilizando como indicador 4 o 5 gotas de fenolftaleína.

El color del punto final (rosado tenue) deberá persistir durante diez segundos.

b) Humedad

Calibrar el refractómetro con agua destilada. Abrir la platina y sobre el prisma inferior depositar unas gotas de miel de abeja y ajustar contra el prisma superior. Dejar en reposo de 2 a 5 minutos. Procedemos a observar por el ocular, visualizando el campo dividido en una zona oscura y otra iluminada con una línea neta de separación. Leer el índice de refracción en la escala lateral.

c) pH

Para determinar este valor se utiliza el potenciómetro.

d) HMF (Hidroximetilfulfural)

Pesar 5 gr de miel en un vaso de precipitado y disolver con 5 ml aprox. de agua destilada. Llevar la solución a una pera de decantación, adicionar posteriormente 10ml de éter de petróleo, mezclar suavemente y esperar. Descartar la parte etérea y llevar la solución a un vaso de precipitado y colocarlo a la estufa a 30°.

Posteriormente se le adiciono 2ml de resorcinol. (50)

Tabla N°7 valores obtenidos del análisis físico- químico

Parámetros	Valores
Acidez	22meq. de ácido /1000g
Humedad	18%
Hidroximetilfulfural	negativo
pH	4.1

B- Preparación de las diferentes concentraciones de la miel de abeja

Se realizó un ensayo control para verificar que la miel se encuentre libre de contaminantes.

Posteriormente se realizó las diluciones de las concentraciones correspondientes utilizando la fórmula matemática $C_1V_1=C_2V_2$, se procedió al pesado 37.5 gr. de miel, el cual se le agrego 12.5ml de agua destilada estéril para obtener una concentración de 75%, se procede a filtrar con un filtro de 0.22 μ m, seguido se toma la solución filtrada 10ml y se añade 5ml de agua destilada para obtener la concentración de 50%, finalizando se toma de esta última dilución 7.5ml y se le añade 7.5ml de agua destilada para obtener la concentración final de 25%.

C- Obtención de la cepa

La cepa de *S. pneumoniae* ATCC 49619 fue obtenida del Instituto Nacional de Salud y fue transportada hacia el laboratorio especializado de microbiología del Instituto Nacional de Salud del Niño – San Borja.

D- Preparación del inóculo

Se realizó según estándares establecidos por NCCLS.

En un tubo de ensayo estéril con 3 mL de solución salina de 0.9% se le agrego colonias de un cultivo fresco de la cepa de *Streptococcus pneumoniae* (crecimiento de toda la noche en agar sangre a 37°) y se llevó a una turbidez de 0.5 de la escala de Mc Farland bajo condiciones estériles. (45)

E- Cultivo de la cepa

La cepa estándar de *Streptococcus pneumoniae* fue cultivada en medio agar Mueller - Hinton suplementado (5% de sangre de carnero) e incubada en posición invertida a 35 °C por 20-24 horas en condiciones de anaerobiosis en una jarra con una vela en extinción. (49) (45)

F- Reconocimiento de la cepa

Se realizó mediante la coloración de Gram el cual me permitió observar la morfología microscópica característica del *Streptococcus pneumoniae*.

Procedimiento:

- Se emulsiona la colonia de *Streptococcus pneumoniae* en una gota de solución salina fisiológica estéril sobre un portaobjetos limpio.
- Se dejó secar, posteriormente se fijó al calor.
- Se coloreo con tinción Gram y se observó al microscopio con un objetivo de inmersión (1000X) y se determinó la presencia de diplococos lanceolados Gram positivos. (51)

Las placas petri inoculadas con cepa de *Streptococcus pneumoniae* fueron distribuidas en tres grupos:

- 3 placas petri con *Streptococcus pneumoniae* donde se inoculo miel de abeja a una concentración de 25%.
- 3 placas petri con *Streptococcus pneumoniae* donde se inoculo miel de abeja a una concentración de 50%.
- 3 placas petri con *Streptococcus pneumoniae* donde se inoculo miel de abeja a una concentración de 75%.

F- Determinación de sensibilidad o resistencia antibacteriana

- Se determinó a través de:

Difusión de discos antibacterianos (Kirby - Bauer)

Método de Kirby y Bauer a través de la difusión de discos. Se adquirieron las placas petri con medio Agar Müller -Hinton suplementado (5% de sangre de carnero) del Laboratorio AREZ, es un producto ya estandarizado y elaborado bajo normas adecuadas, Una vez reactivada la cepa *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, se diluyo las cepas en un tubo de ensayo con 3 ml de solución salina al 0.9% hasta obtener una dilución de 0.5 Mc Farland

La siembra se realizó utilizando hisopos estériles embebidos en los cultivos de la respectiva bacteria; el estriado se realizó tres veces por toda la superficie de la placa, rotando la placa en un giro de 60 grados por cada inoculación.

Previamente se preparó discos de papel filtro (Watmann Nro. 4) estériles de 6 mm de diámetro, los cuales fueron sumergidos dentro de las concentraciones experimentales de 25%, 50%, y 75% de miel de abeja por un periodo de una hora, cuando las placas de Müller- Hinton estuvieron secas se procedió a colocar los discos con una pinza estéril, sobre los cultivos de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619; todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10cm de la llama de un mechero; se empleó como grupo control positivo discos de Oxacilina (OXA) de 1 µg y grupo control negativo discos embebidos con agua destilada.

Posteriormente, las placas se colocaron en posición invertida y se procedió a incubar en anaerobiosis utilizando una jarra, con el método de la vela, a una temperatura de 35° C.

Después de una incubación de 20-24 horas, se midió el diámetro de cada zona de inhibición. (45)

Método modificado de pozos en agar

Se realizó el frotis del inóculo sobre cada una de las superficies de los agares selectivos estipulados para éste método. Posteriormente, se hicieron los pozos sobre la superficie de los agares con ayuda de un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro, y en cada uno de ellos se vertieron 60 µL de las concentraciones experimentales de 25%, 50%, y 75% de miel de abeja por triplicado. Posteriormente, se incubaron y leyeron las placas de igual forma que el método Kirby - Bauer. (52)

Evaluación del Efecto Antibacteriano

La evaluación se realizó tanto cuantitativamente por medición numérica de los halos de inhibición, y cualitativamente tomando como referencia las pautas por Duraffourd. (53)

Escala de Duraffourd:

Escala utilizada para determinar cualitativamente el efecto inhibitorio in vitro, según diámetro de inhibición. (53)

- 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.

CAPITULO IV: PRESENTACION Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS

4.1 PROCESAMIENTO DE DATOS: Resultados

Los datos fueron procesados mediante el paquete estadístico Stata (versión 14), con el que se realizó los siguientes procedimientos estadísticos de análisis:

- a) Obtención de medias con su respectiva desviación estándar.
- b) Se presenta los resultados en tablas con su respectiva representación gráfica.
- c) Se considerará un margen de error estadístico de 5%.

Ficha De Recolección De Datos

Recolección de datos: Se ha tomado las medidas de los halos de inhibición (en mm) y se presentan en la tabla 1.

Tabla N° 8. Registro Microbiológico de la inhibición de miel sobre *S. pneumoniae* ATCC 49619.

Miel de Abeja					
Concentraciones					
Halos de Inhibición (mm)					
N° PLACAS	Control Positivo	Control Negativo	25%	50%	75%
1	20	6	6	10	16
2	20	6	10	8	18
3	15	6	8	10	18

Fuente: Ficha de recolección de datos.

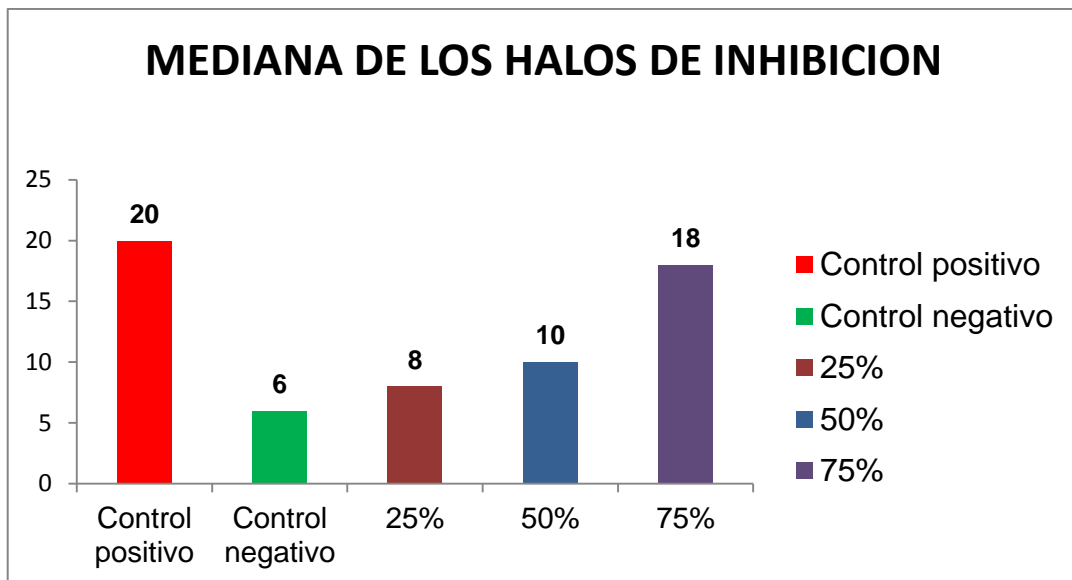
Tabla N° 9. Medidas de los halos de inhibición, valor de la mediana, media, desviación estándar e intervalos de confianza.

Miel de Abeja					
Concentraciones					
Halos de Inhibición (mm)					
N° PLACAS	Control Positivo	Control Negativo	25%	50%	75%
1	20	6	6	10	16
2	20	6	10	8	18
3	15	6	8	10	18
Mediana	20.00	6.000	8.000	10.00	18.00
Media		6.000	8.000	9.333	17.33
Desviación estándar	2.886	0.0	2.000	1.155	1.155
I.C 95% inferior			3.032	6.465	14.46
I.C 95% superior			12.97	12.20	20.20

Fuente: Ficha de recolección de datos.

Grafico 1. Mediana de los halos de inhibición

El Grafico 1 muestra la mediana de los halos de inhibición donde se puede apreciar un halo superior del control positivo, seguido de la concentración al 75% y 50%.



Fuente: Ficha de recolección de datos.

Tabla N° 10. Efecto inhibitorio *in vitro* de miel sobre *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 según la escala de Duraffourd

Miel (concentración)	Media Halo (mm)	Escala de Duraffourd
25%	8	Nula
50%	10	Sensible
75%	18	Muy sensible

Fuente: Ficha de recolección de datos.

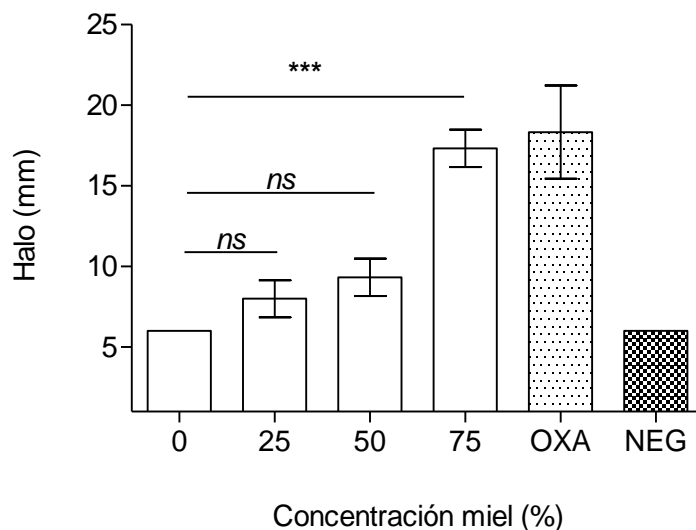


Grafico 2. Efecto inhibitorio de la miel de abeja (*Apis mellifera*) sobre *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

Las bacterias fueron suspendidas en solución salina al 0.9% en una placa de agar Müller- Hinton y se adicione discos impregnados con 10 uL de Miel de abeja a diferentes concentraciones. Se usó un disco del antibiótico Oxacilina (OXA) como control positivo y un disco seco como control negativo. Los datos pertenecen a 3 repeticiones. La barras indican la Desviación estándar; **ns** indica no significativo y ******* denota $P < 0.001$ significativamente, usando la prueba de “one-way analysis of variance” con el post-test de comparación múltiple de Dunnett.

Tabla N° 11. Resumen 95% del Intervalo de Confianza con el post-test de comparación múltiple de Dunnett.

Intervalo de confianza 95%				
0 v/s 25	-2.000	1.837 No	ns	-5.374 a 1.374
0 v/s 50	-3.333	3.062 No	ns	-6.708 a 0.04086
0 v/s 75	-11.33	10.41 Yes	Significativo	-14.71 a -7.959

4.2 CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

H: La concentración de la miel de abeja al 75% tiene efecto antibacteriano frente a la cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

4.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio se evaluó el efecto antibacteriano de miel de abeja multiflora proveniente del Distrito de Lurín, sobre una cepa de *Streptococcus pneumoniae*, investigación realizada *in vitro*, los resultados de la presente investigación corroboraron la acción antibacteriana de la miel de abeja. Por otra parte las diluciones de miel que mostraron efecto antibacteriano con un halo de inhibición mayor a 8mm fue de 75% concordando con las investigaciones realizadas por diversos autores.

Este estudio coincide con el de Bautista quien en el 2011 analizó el efecto antibacteriano de la miel de abeja a diferentes concentraciones sobre el

Streptococcus mutans hallando en la concentración al 30% halos de 11.4mm y en la concentración al 100% halo de inhibición de 18.6 mm resultados muy similares al nuestro.

Podemos mencionar también a los investigadores Huttunen S, Riihinen K, Kauhanen J, et al. quienes analizaron en el 2012 la actividad antimicrobiana de diferentes mieles monoflorales finlandesas contra bacterias patógenas humanas encontrando actividad microbiana sobre el *S. pneumoniae*, obteniendo resultados significativamente sensible a todas las mieles probadas.

La mejor actividad se obtuvo con la miel de sauce utilizando concentraciones mayores al 40% coincidiendo de esta manera con esta investigación donde demostramos que a concentraciones mayores al 50% la miel de abeja causa efecto inhibitorio.

Así también Carrión K. En el 2016 evaluó *in vitro* el efecto antibacteriano de la miel de abeja de la Sierra y Costa Ecuatoriana ante cepas de *Streptococcus mutans* llegando a la conclusión que la miel de la sierra se muestra más efectiva en concentraciones al 50% y 80% con halos de inhibición de 9mm y 12.4mm respectivamente a diferencia de la miel de la costa que mostro efectividad solamente al 80% con halo de 9.6mm resultados similares al nuestro. (23)

Este estudio pone en evidencia que la miel de abeja puede tener un efecto inhibitorio frente a bacterias del tracto respiratorio.

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

1. La miel de abeja al 25% no presenta sensibilidad sobre el *Streptococcus pneumoniae* con promedios de halos de inhibición de (8mm).
2. En cuanto a la miel de abeja al 50 % presenta sensibilidad sobre el *Streptococcus pneumoniae* con un promedio de halo de inhibición de (9.333mm).
3. La concentración de miel de abeja que presentó mayor sensibilidad sobre el *Streptococcus pneumoniae* fue la de 75 % con un promedio de halo de inhibición de (17.333mm), presentando una diferencia estadísticamente significativa de ($P < 0.001$) con respecto a la de 25%.

5.2 RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar estudios analíticos específicos para conocer con mayor detalle el efecto antibacteriano de la miel de abeja e inclusive realizar ensayos en animales de experimentación.
2. Se recomienda realizar estudios comparativos con mieles de diversas zonas geográficas de nuestro país.
3. Se recomienda realizar estudios sobre la posibilidad de una acción sinérgica de la miel de abeja contra diversos antimicrobianos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acquarone CA. Parámetros fisicoquímicos de mieles, relación. Tesis. Buenos Aires: Universidad de Belgrano; 2004.
2. Bradbear N. La apicultura y los medios de vida sostenibles. In Bradbear N. La apicultura y los medios de vida sostenibles. ROMA- ITALIA; 2005. p. 70.
3. Molan PC. The Antibacterial Activity of Honey. Original Article. New Zealand: University of Waikato, Department of Biological Sciences; 1992.
4. Molan M, French A, Cooper and P. C. The antibacterial activity of honey against coagulase-negative. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2005; 56(228-231).
5. Fukuda J, Echevarria J, Llanos F, et al.. Streptococcus pneumoniae resistentes a Penicilina en Lima – Peru. Rev Med Hered. 1996; 7(11-16).
6. Torres N, Velásquez R, Mercado Erick et al. Resistencia Antibiotica de Streptococcus pneumoniae en portadores nasofaríngeos sanos de siete regiones del Peru. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2013; 30 (4)(575- 82).
7. Luna A, Mercado E, Del Águila O et al. Resistencia Antibiotica y Distribucion de Serotipos de Streptococcus Pneumoniae en el Peru. Rev. Perú. pediátr. ; 69(1).
8. Velásquez E, Torres N, Horna G, et al. Sensibilidad antibiótica de Streptococcus pneumoniae en portadores. Acta Med Per. 2008; 25(3).
9. Martos A, Oré J, Paredes S, et al. Boletín Apícola del Peru. Boletín. Lima - Peru: Universidad Nacional Agraria La Molina ; Marzo - 2016.
10. Gérvás J. La resistencia a los antibióticos, un problema de salud pública. Aten Primaria 2000. 2000 Mayo; 25(8).
11. Prado V. Conceptos microbiológicos de Streptococcus pneumoniae. Rev Chil Infect. 2001; 18(6-9).
12. Ruvinsky R, Gentile A, Regueira M, et al. Infecciones invasivas por Streptococcus pneumoniae: estudio epidemiológico e importancia del desarrollo de un sistema de vigilancia. Arch. argent. pediátr. 2002; 100(1).
13. Koneman E, Winn W, Allen S, et al. Koneman Diagnóstico Microbiológico. Sexta ed. Buenos Aires - Argentina: Editorial Medica Panamericana S.A.; 2008.

14. OMS. Organizacion Mundial de la Salud. [Online].; 2016 [cited 2017 Octubre]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/es/>.
15. Salud OMDl. Centro de Prensa OMS. [Online].; 2014 [cited 2017 Noviembre 13]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>.
16. Pasco G, Sanchez F. Efecto Antibacteriano in vitro de miel de abejas apis mellifera en cepas de streptococcus mutans. Tesis. Trujillo - Peru: Universidad Nacional de Trujillo; 2010.
17. Bautista R. Efecto Antibacteriano de la Miel de Abeja en Diferentes Concentraciones Sobre el Estreptococo Mutans. Tesis. Lima - Peru: Universidad San Martin de Porres; 2011.
18. Cooper R, Molan C. Harding K. Antibacterial activity of honey against strains of Staphylococcus aureus from infected wounds. J R Soc Med. 1999; 92(283-285).
19. Gamboa M, Figueroa J. Poder Antibacterial de Miel de Tetragonisca angustula Valorada por Concentraciòn Minima Inhibitoria. Acta biol. Colomb. 2009; 14 (2)(97 - 106).
20. Henriques A, Jenkins R, Burton N. The effect of manuka honey on the structure. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011; 30(167–171).
21. Huttunen S, Riihinen K, Kauhanen J, et al. Antimicrobial activity of different Finnish monofloral honeys against human pathogenic bacteria. Apmis. Published by John Wiley & Sons Ltd. 2012 Agosto; 121(827-834).
22. Becerra D, Cabrera J, Solano M. Efecto antibacteriano de la miel de abeja en sus diferentes concentraciones frente al Staphylococcus aureus. Rev Cient Cienc Med. 2016; 19 (2)(38-42).
23. Carrion k. "Evaluacion in Vitro del Efecto Antibacteriano de la Miel de Abeja de la Sierra y Costa Ecuatoriana ante Cepas de Estreptococo Mutans". Tesis. Quito - Ecuador: UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR; 2016.
24. Murray P, Baron E , Paller M, et al. Manual de Microbiologia Clinica. septima ed. Washington: Elsevier España, S.L.; 1999.
25. I.N.S. Programa de Vigilancia de los Serotipos y Resistencia Antimicrobiana de Streptococcus pneumoniae y Haemophilus influenzae. Manual. Colombia: Instituto Nacional de Salud; 2004.
26. Bennett J, Dolin R, Blaser M. Enfermedades Infecciosas Principios y Practica.

- Octava ed. Barcelona España: Elsevier España, S.L.U; 2016.
27. Martos A. Boletín Apícola del Perú. Boletín. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima; 2015 Junio.
 28. Reyes J, Cano P. Manual de Polinización Apícola. 2000..
 29. Senasa. GUÍA DE BUENAS PRÁCTICAS APÍCOLAS. [Online].; 2014 [cited 2018 Enero 22. Available from: www.senasa.gob.pe.
 30. SENASA. www.senasa.gob.pe. [Online].; 2014 [cited 2018 Enero. Available from: www.senasa.gob.pe.
 31. Avalos H, Rodas E, Perdomo R et al. Manual de Buenas Prácticas Apícolas para la Producción de Miel. Manual. El Salvador: Comisión Nacional Apícola CONAPIS; 2004 Septiembre.
 32. Información del Codex alimentarius sobre la miel. Revised Codex Standard for Honey Codex Stan. Roma - Italia;; 2001.
 33. Cruzado L, Gutierrez D, Ruiz S. Ensayo químico y efecto de antibiosis in vitro de la miel de abeja sobre microorganismos grampositivos y gramnegativos. Rev. Med. Vallejana. 2007; Vol 4(2).
 34. Suescún L, Vit P. Control de calidad de la miel de abejas producida como propuesta para un proyecto de servicio comunitario obligatorio. Fuerza Farmacéutica. 2008 Enero ; I.
 35. Pascual-Maté A, Osés S, Fernández-Muiño M, et al. Methods of analysis of honey. Journal of Apicultural Research. 2017 Noviembre; 57(1).
 36. MINSA. Resolución Ministerial. Oficio 58-68/2008/DG/ DIGESA. Lima: Ministerio de Salud, Lima; 2008.
 37. Cornara L, Biagi M, Xiao J et al. Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from different honeybee Products. Frontiers in Pharmacology. 2017; 8(412).
 38. Asociación de Microbiología y Salud. [Online].; 2016 [cited 2017 Octubre 28/10. Available from: <http://www.microbiologiaysalud.org>.
 39. Ewnetu Y, Lemma W, Birhane N. Antibacterial effects of Apis mellifera and stingless bees honeys on susceptible and resistant strains of Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Klebsiella pneumoniae in Gondar Northwest Ethiopia. BioMed Central. 2013; 13(269).

40. El-Kased R, Amer R, Attia D, et al. Honey-based hydrogel: In vitro and comparative In vivo evaluation for burn wound healing. *Scientific reports*. 2017; 7(9692).
41. Cabrera L, Céspedes E, Nava R, et al. Actividad Antibacteriana No-Peróxido de Miel de Zulianas. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 2006; XVI(5).
42. Islam N, Khalil I, Islam A, et al. Toxic compounds in honey. *J. Appl. Toxicol.* 2013 Setiembre;().
43. Edgar J, Roeder E, Molyneux R. Honey from Plants Containing Pyrrolizidine Alkaloids: A Potential Threat to Health. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50(2719-2730).
44. Cifuentes L. Allergy to honeybee... not only stings. *Wolters Kluwer Health, Inc.* August 2015; Vol 15(4).
45. Perilla M, Ajello G, Bopp C, et al. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. Manual. Organización Mundial de la Salud; 2004.
46. Duttmann C, Demedio J, Verde M. La Apicultura y Factores que Influyen en Producción, Calidad, Inocuidad y Comercio de la Miel. Nicaragua: Investigación Intersectorial de la Sanidad Apícola en el Occidente de Nicaragua; 2013.
47. Brooks G, Morse S, Carroll K, et al. *Microbiología Médica*. 25th ed. Mexico: Mc Graw-Hill Interamericana Editores, S.A; 2010.
48. Servicios CBTlyd. *Microbiología*. [Online].; 2014 [cited 2017 Octubre. Available from: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.pe/>.
49. Sacaquispe R, Velásquez J. Manual de Procedimientos Para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana Por el Metodo de Disco Difusión. Manual. Lima-Peru: Instituto Nacional de Salud; 2002.
50. Horwitz W. *AOAC Official Methods of Analysis International*. 1996; II(16th).
51. Programa de Vigilancia de los Serotipos y Resistencia Antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. Manual. Colombia: Instituto Nacional de Salud; 2004.
52. Rojas J, Garcia A, Lopez A. Evaluación de dos Metodologías para Determinar la Actividad Antimicrobiana de Plantas Medicinales. *BLACPMA*. 2005 Marzo; 4(2).

53. Duraffourd C, Hervicourt L, Lapraz J. Cuadernos de Fitoterapia Clinica. 4th ed. Barcelona: Masson; 1987.

ANEXO 1. Solicitud de Cepa ATCC *Streptococcus pneumoniae* al I.N.S.

CARGO

**MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD**

NOTA INFORMATIVA N°00148-17-LAB.IRAS-DEET-CNSP/INS

A : Lic. LUIS MARIN REYES
DIRECTOR EJECUTIVO DE LA DEET

DE : BLGO. FAVIOLA VALDIVIA GUERRERO
RESPONSABLE LABORATORIO IRAS

ASUNTO : **SOLICITUD DE CEPA ATCC *Streptococcus pneumoniae* AL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO-SAN BORJA**

REFERENCIA : REGISTRO N° 23565-2017

FECHA : LIMA, 02 DE NOVIEMBRE 2017

Es grato dirigirme a usted para saludarlo muy cordialmente y a la vez, en relación a las cepa solicitadas por el Instituto Nacional de Salud del Niño de San Borja para la ejecución de tesis titulado "Efecto Antibacteriano de la miel de abeja sobre el *Streptococcus pneumoniae*" por la estudiante Bellido Gutiérrez María Angélica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega; A este respecto en cumplimiento a los objetivos de del Instituto Nacional e investigación se va proporcionar la cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, sin embargo es necesario tener en consideración lo siguiente este microorganismo es muy lábil por esa razón debe ser conservado en caldo TSB con 20% de glicerol y almacenado a temperaturas de criopreservación en (-70°C).

La cepa en mención será entregada en un sistema de transporte carbón de amies donde podrá tenerla viable a temperatura ambiente por un lapso de 3 días aproximadamente.

Atentamente,



Blga. Faviola Valdivia Guerrero
Responsable de Laboratorio de IRA

ANEXO 2. Certificado de Analisis del Agar Mueller Hinton suplementado



Certificado de Análisis

Fecha de Emisión
27/06/2017

Código Producto: PA901004

Descripción: Agar Mueller Hinton Placa 90x15 mm

Lote: MHS0023

Fecha Elaboración: 05/11/2017

Fecha Vencimiento: 20/12/2017

El agar se preparó a partir del medio deshidratado BD Mueller Hinton Agar, siguiendo las instrucciones del fabricante y se adicionó 5% de sangre estéril de carnero.

Ensayos

Apariencia	Medio de cultivo ámbar claro	Conforme
Esterilidad	Incubación a 35°C x 24 horas	Conforme
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Incubación a 35°C x 24 horas	Crecimiento.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Incubación a 35°C x 24 horas	Crecimiento.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Incubación a 35°C x 24 horas	Crecimiento.


Luis Alvarado Rios
ICTMP 6765

ANEXO 3. Ficha de recolección de datos

TESIS:

EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE LA MIEL DE ABEJA
“*Apis mellifera*” DEL CENTRO APICULTOR “RINCONADA ALTA” DEL DISTRITO
DE LURIN FRENTE A LA CEPA DE *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

Miel de Abeja					
Concentraciones					
Halos de Inhibición (mm)					
N° PLACAS	Control Positivo	Control Negativo	25%	50%	75%
	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)
1					
2					
3					

ANEXO 4. Resultado de análisis estadístico usando “one-way analysis of variance” con el post-test de comparación múltiple de Dunnett

Parameter

Table Analyzed Repeated measures one-way ANOVA data

Repeated Measures ANOVA

P value 0.0002

P value summary ***

Are means signif. different? (P < 0.05) Yes

Number of groups 4

F 41.69

R squared 0.9542

Was the pairing significantly effective?

R squared 0.01132

F 0.7500

P value 0.5120

P value summary ns

Is there significant matching? (P < 0.05) No

ANOVA Table SS df MS

Treatment (between columns) 222.3 3 74.11

Individual (between rows) 2.667 2 1.333

Residual (random) 10.67 6 1.778

Total 235.7 11

Dunnett's Multiple Comparison Test Mean Diff. q Significant? P < 0.05?

Summary 95% CI of diff

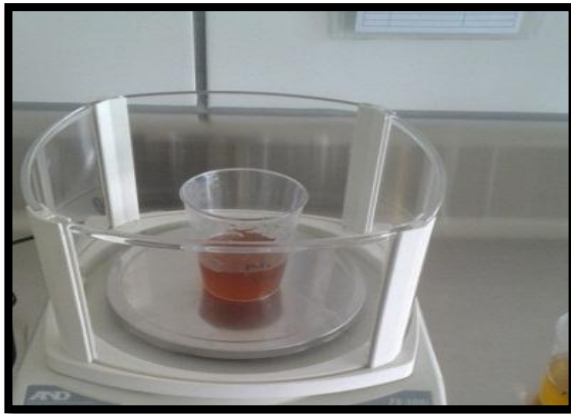
0 vs 25 -2.000 1.837 No ns -5.374 to 1.374

0 vs 50 -3.333 3.062 No ns -6.708 to 0.04086

0 vs 75 -11.33 10.41 Yes *** -14.71 to -7.959

ANEXO 5. Testimonios fotográficos

Análisis Organoléptico de la miel de Abeja



Determinación:

- Olor
- Color
- sabor
- Aspecto

Escala de Pfund para determinar el color

Análisis Físico- químico de la miel de Abeja

Determinación de Acidez



Determinación de Humedad



Determinación de HMF



Resultado negativo para HMF



Determinación del pH



Preparación de las concentraciones de la miel de abeja:

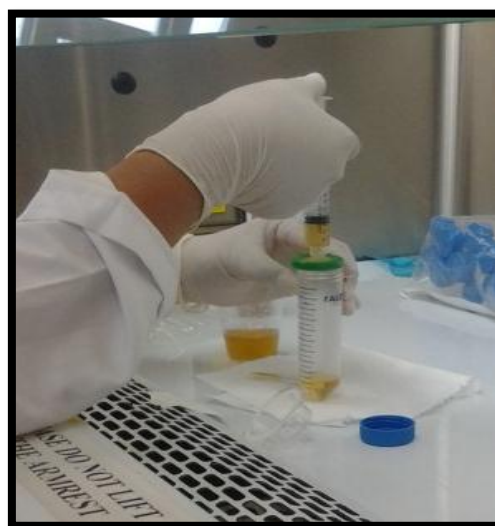


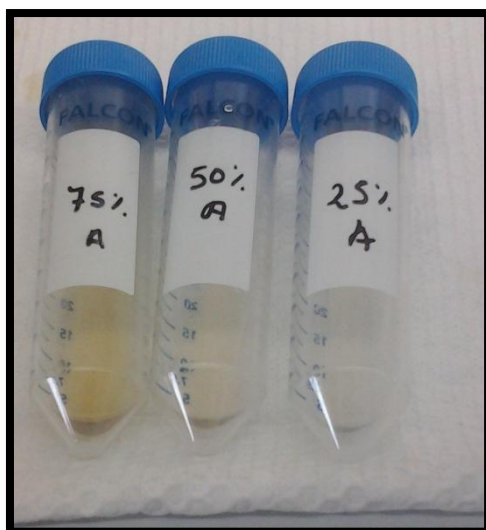
Miel de Abeja



Se realiza el pesado de la miel de abeja 37.5 gr.

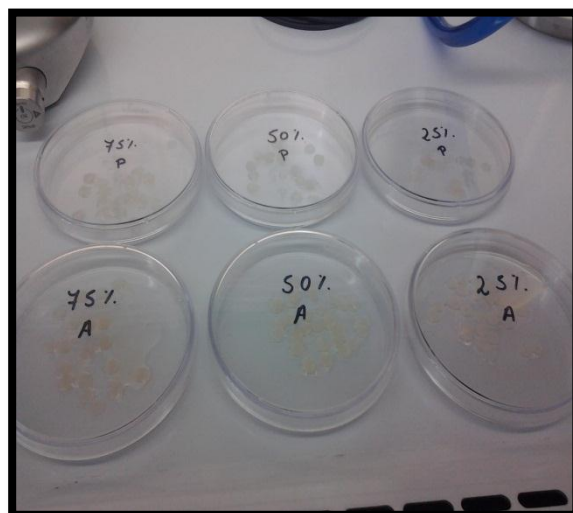
Se procede a filtrar la miel, para asegurarnos que se encuentre libre de contaminantes, previamente agregamos 12.5ml de agua destilada



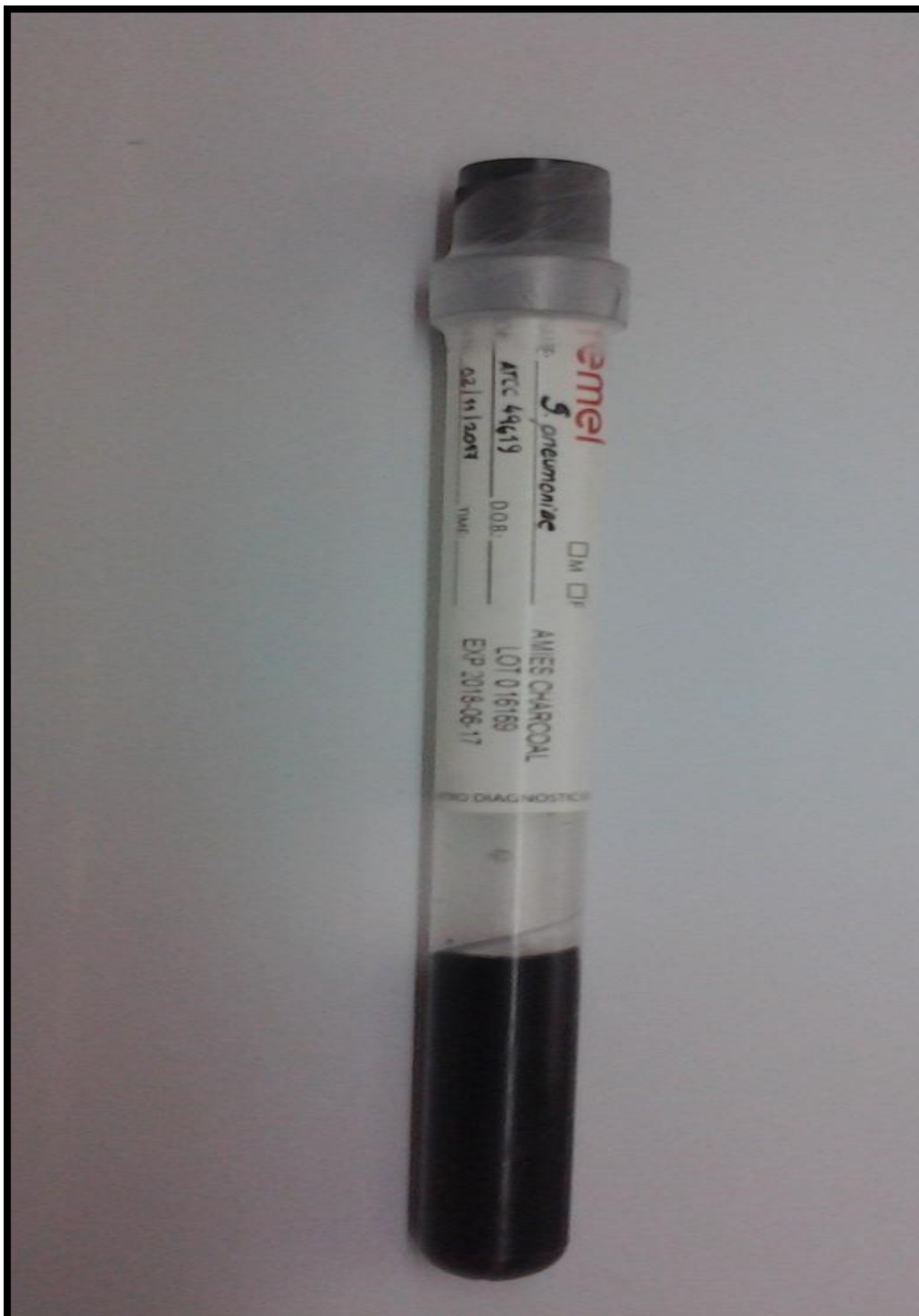


Miel de abeja diluida a concentraciones de 25%, 50% y 75%

Se transfiere con una micropipeta 10 uL de las correspondientes concentraciones de miel sobre los discos de papel whatman N°4 durante 1 hora.



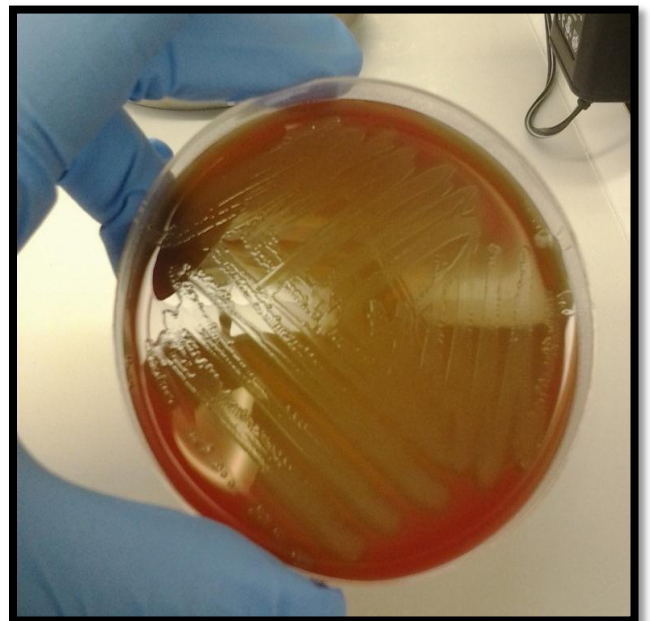
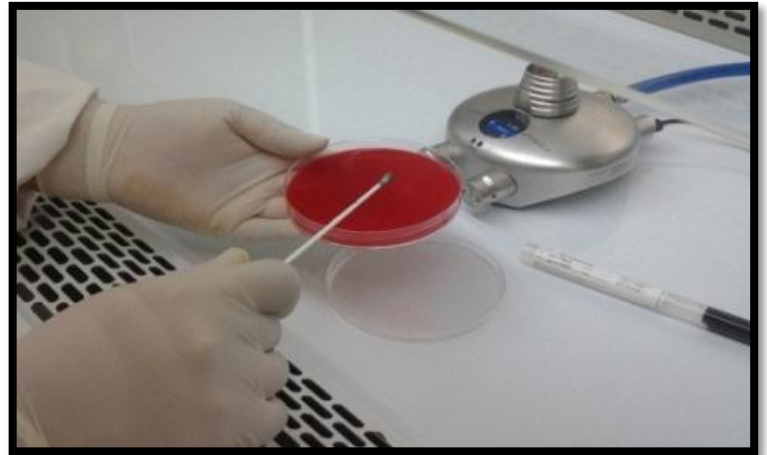
Cepas Estandarizadas de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619
obtenida del I.N.S.



Determinación de sensibilidad antibacteriana por Difusión de discos

(Kirby - Bauer)

Sembrado del
Streptococcus
pneumoniae ATCC
49619 en Agar Sangre



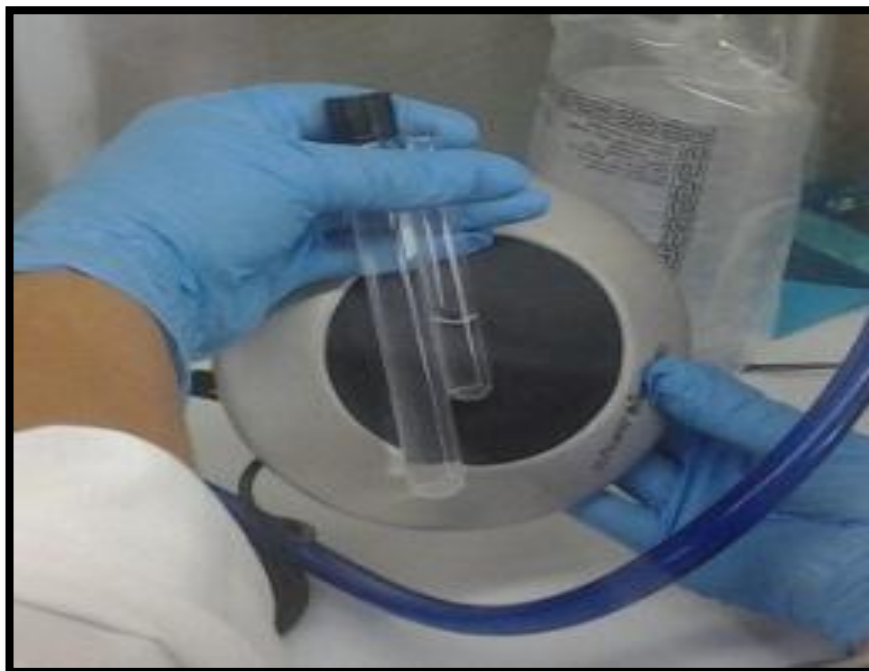
Incubación en posición invertida
a 35° por 20-24 h en condiciones
de anaerobiosis.

Crecimiento bacteriano de
Streptococcus pneumoniae

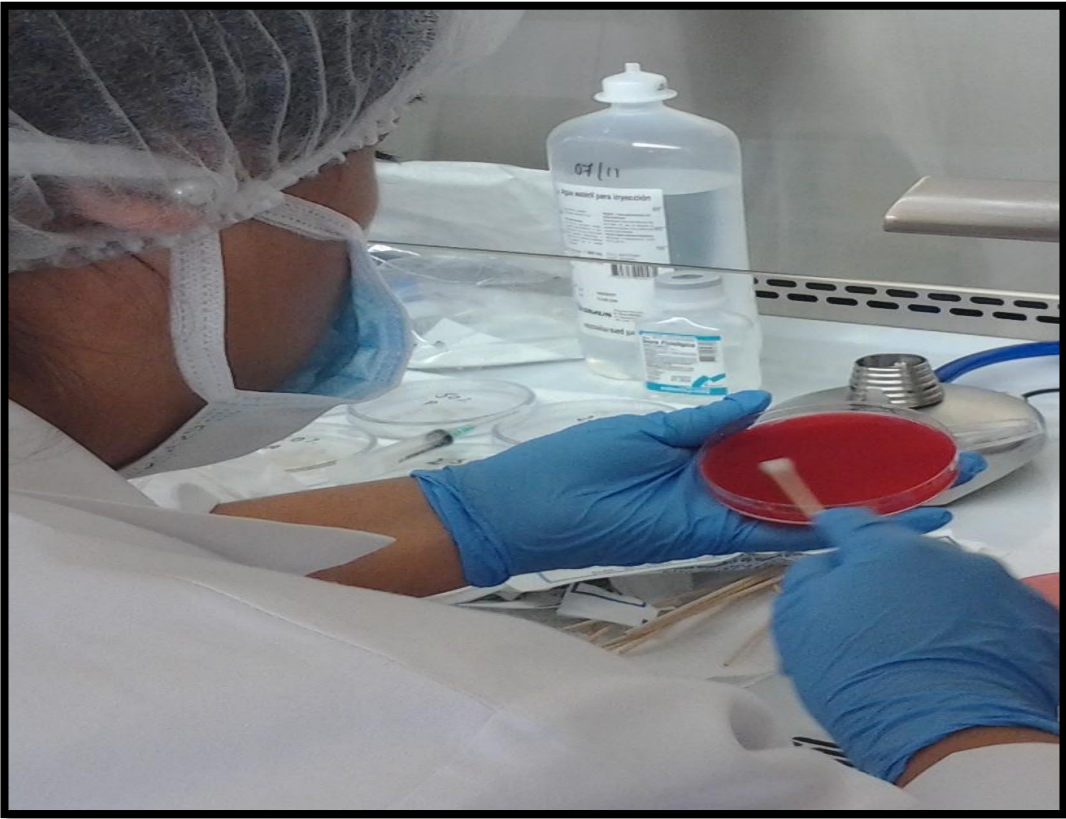
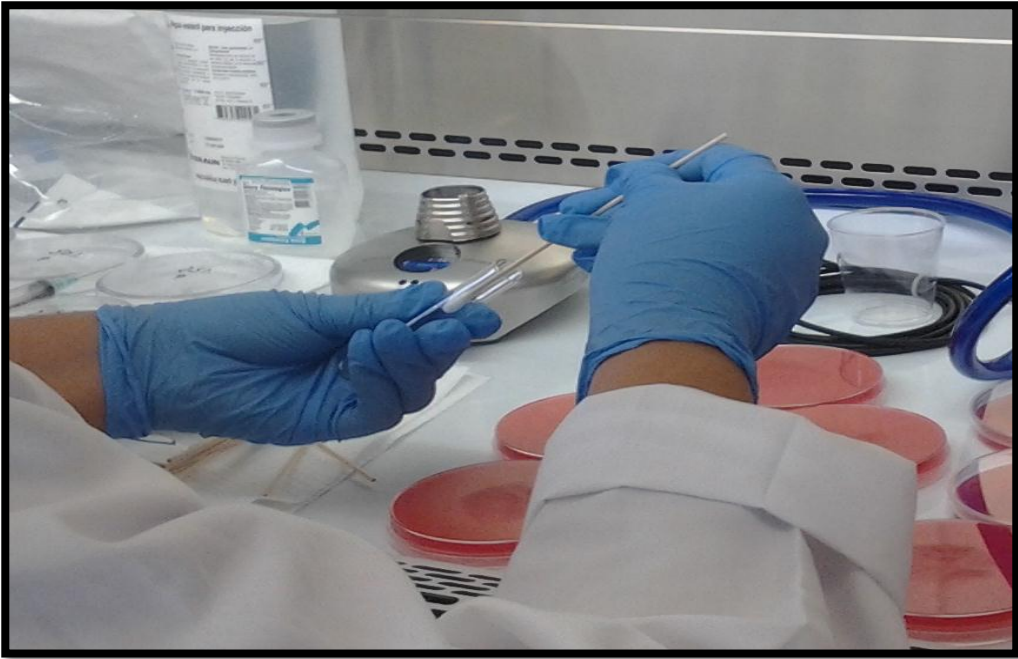
**Procedimiento para alcanzar una turbidez semejante a 0,5
de la escala de Mc Farland**



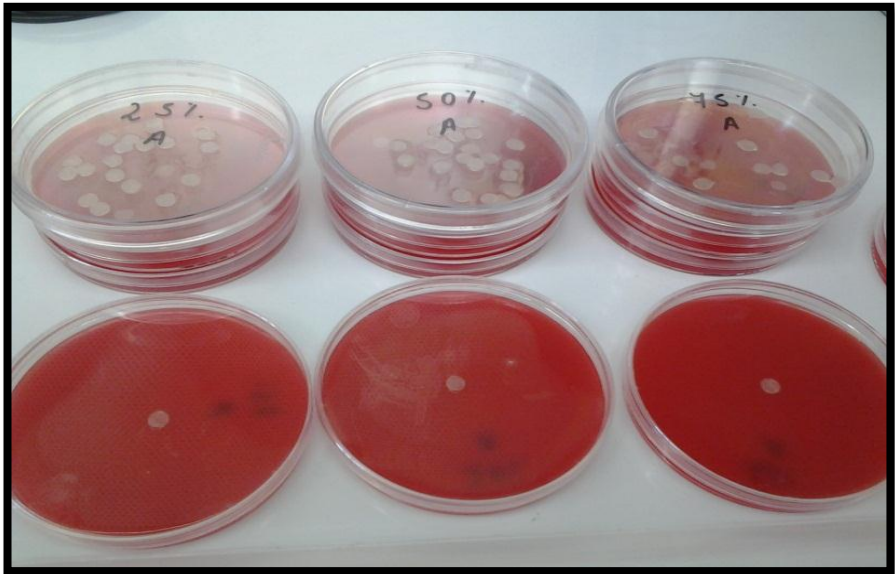
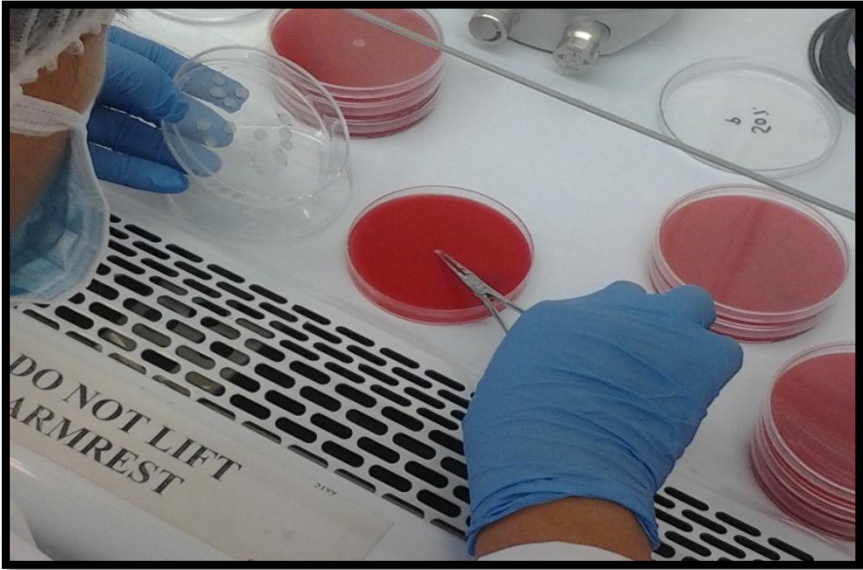
**Con la ayuda de un hisopo estéril,
disolver unas colonias de las cepas en
el tubo estéril con 3ml de solución
salina al 0'9%**



**Sembrado de la Cepa *Streptococcus pneumoniae* ATCC49619
en Agar Müller Hinton (suplementado)**



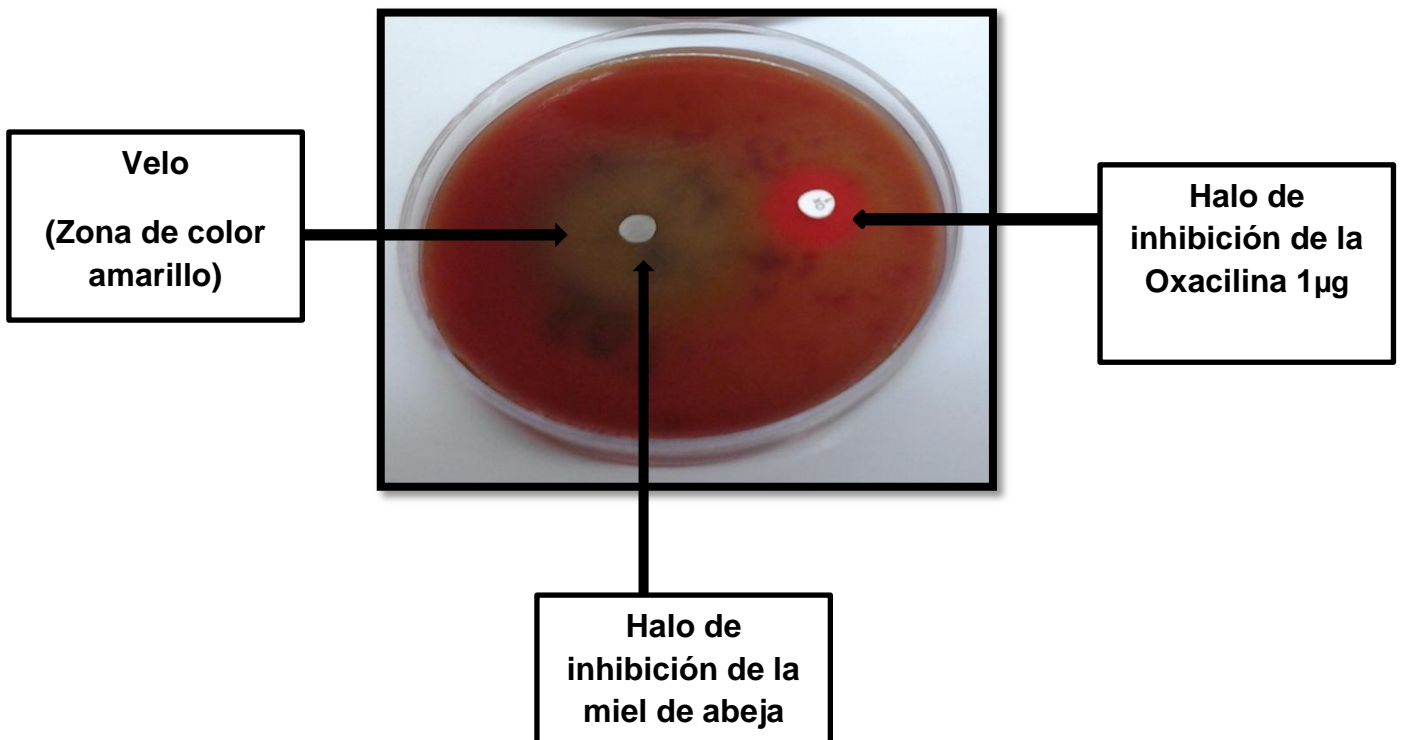
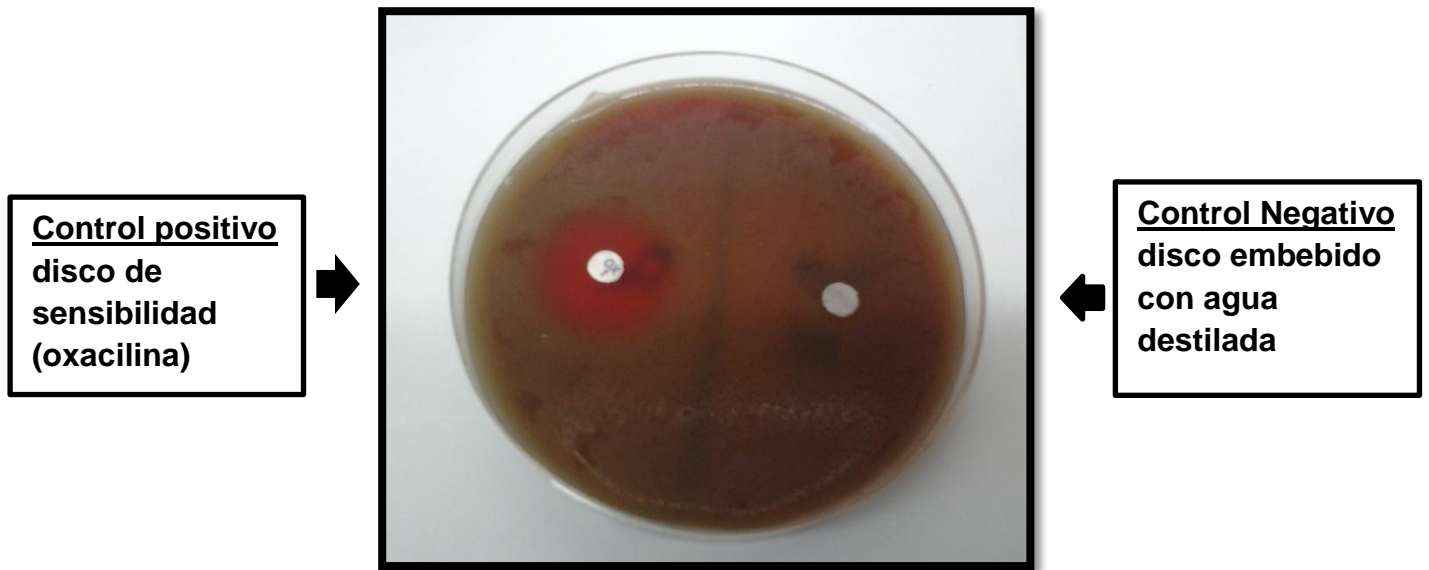
Colocación de discos embebidos en sus respectivas placas con siembra de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619



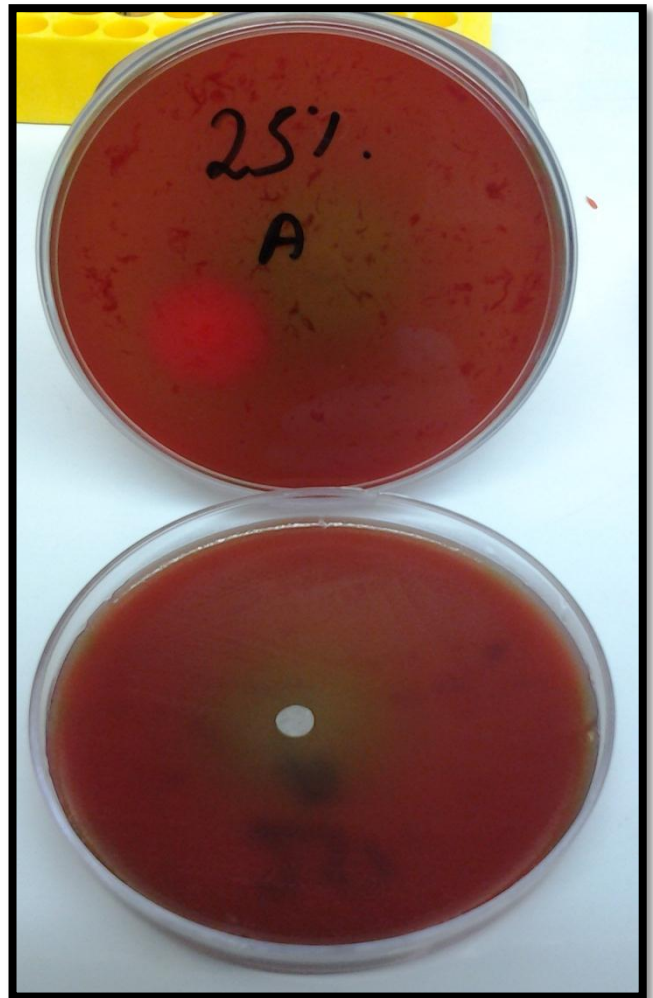
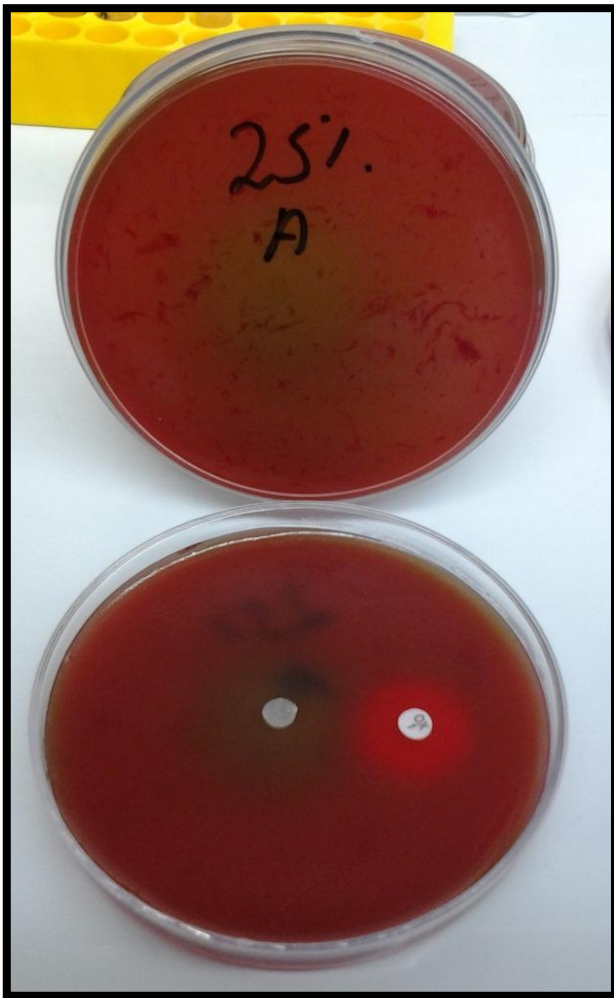
Incubación en anaerobiosis de Placas Petri que contienen discos embebidos sobre siembra de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619



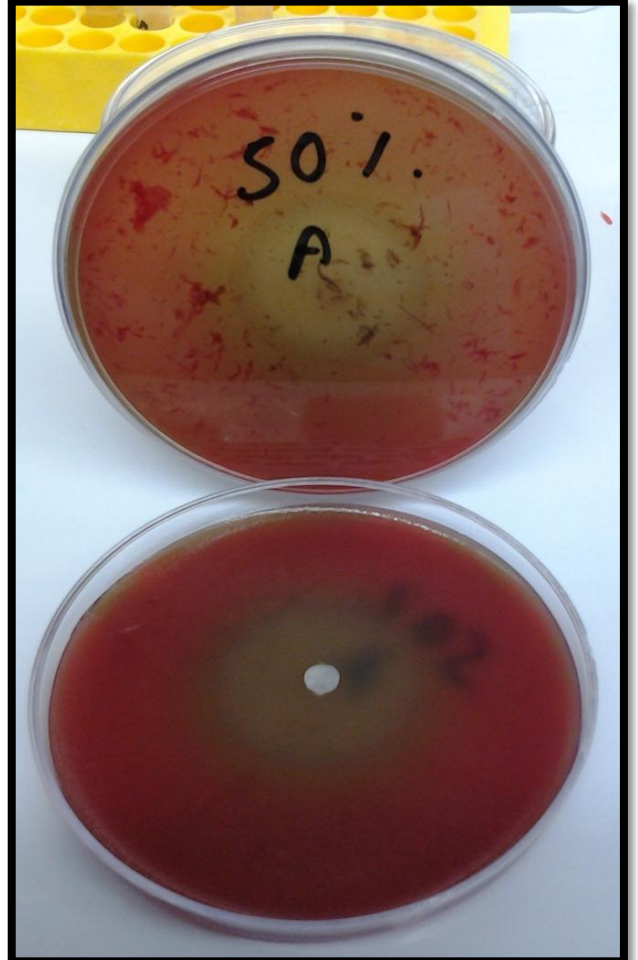
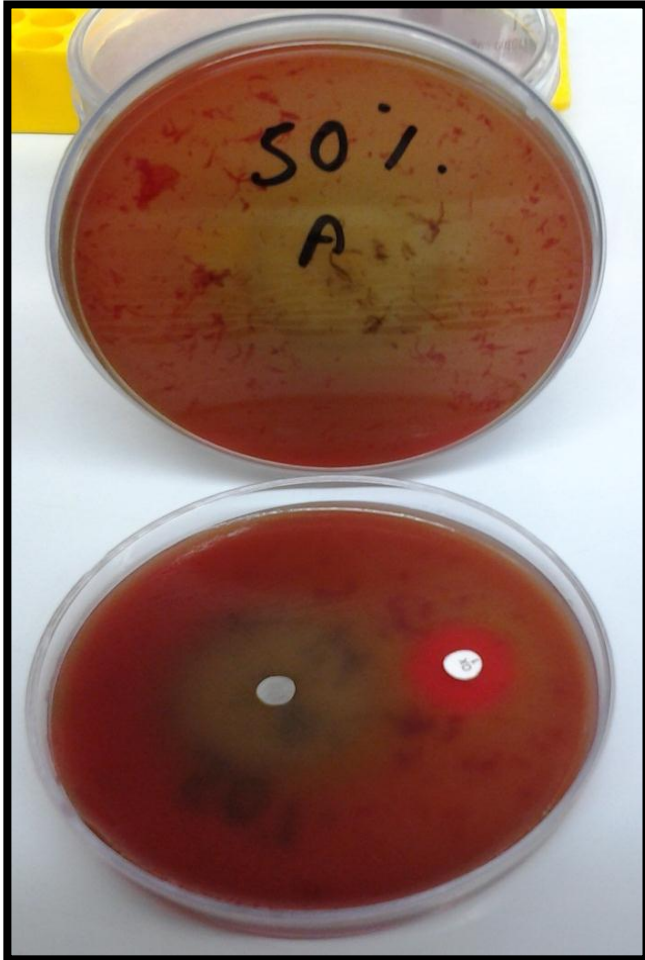
Lectura a las 24 horas de los Halos de inhibición



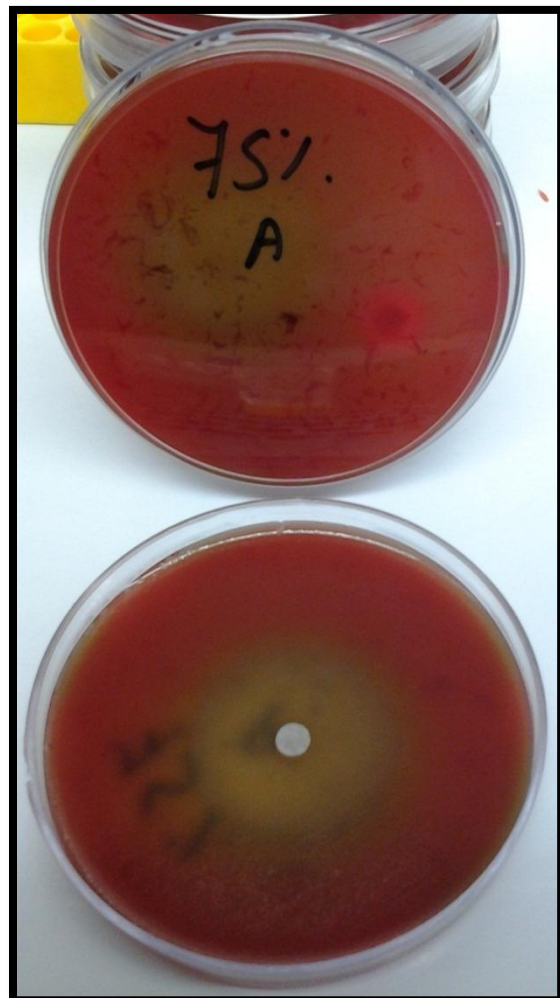
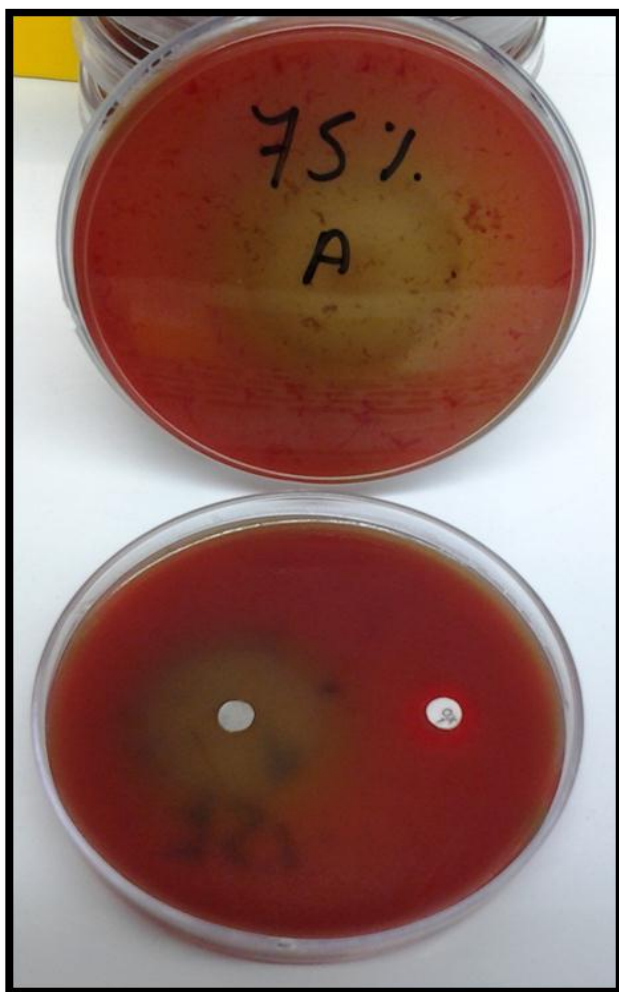
Concentración al 25%



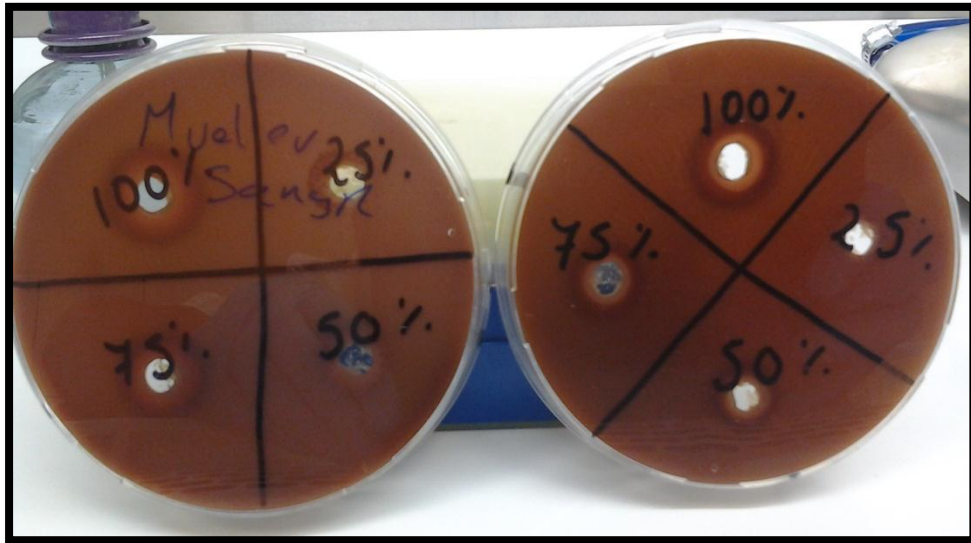
Concentración al 50%



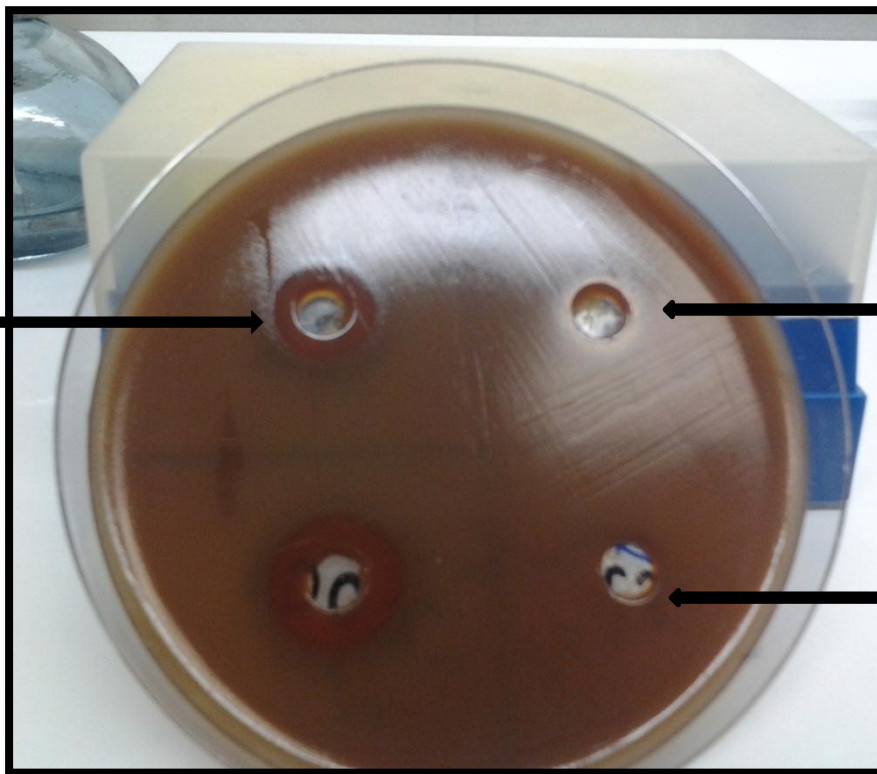
Concentración al 75%



Método modificado de pozos en agar



Concentración
de miel de abeja
al 75%



Concentración
de miel de abeja
al 50%

Concentración
de miel de abeja
al 25%