

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA

“Nuevos Tiempos. Nuevas Ideas”

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA



**Preparación de Agar FLYM a partir de Miel de Abeja y Propóleo de
Apis mellífera para Detectar Contaminantes Bacterianos**

**Tesis para optar el Título Profesional de Químico
Farmacéutico y Bioquímico**

TESISTAS:

BACHILLER MARCOS LEON NAIVARES

BACHILLER YOBER FLORES LOPEZ

ASESOR:

Dr. Q.F. HÉCTOR ALEXANDER VILCHEZ CÁCEDA

**LIMA – PERÚ
2018**

DEDICATORIA

A Dios, el arquitecto del Universo, que desde el cielo me brinda su bendición y da fortaleza a mi mente y corazón, por guiar mi camino y hacer que haya podido terminar la realización del presente proyecto de investigación además de siempre seguir adelante.

A mi familia, por toda su comprensión y apoyo incondicional, así como de sus consejos para mejorar día a día.

MARCOS LEON NAIVARES

A Dios, por permitirme llegar hasta este punto, por estar siempre conmigo y haberme brindado salud para lograr mis objetivos.

A mi Familia, por haberme apoyado en todo momento, por sus valores, fuerza y por la motivación constante que me ha permitido lograr mis metas, pero más que nada, por su cariño.

YOBBER FLORES LOPEZ

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Q.F. Héctor Vílchez Cáceda, nuestro asesor de tesis. Para nosotros es un Maestro y Especialista en el área de Microbiología. Sus enseñanzas hicieron que nosotros nos superemos, muchas gracias por la confianza depositada en nosotros.

A nuestra Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega por brindarnos la tecnología de última generación y docentes con valores los cuales nos brindaron sus experiencias para seguir adelante.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	
Agradecimiento	
Índice de anexos	
Índice de figuras	
Índice de tablas	
Resumen	
Abstract	
Introducción	01
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	03
1.1 Descripción de la realidad problemática	03
1.2. Identificación y formulación del problema.....	04
1.2.1. Problema general.....	04
1.2.2. Problemas específicos	04
1.3. Objetivos de la investigación	04
1.3.1. Objetivo general	04
1.3.2. Objetivos específicos	04
1.4. Justificación y viabilidad de la investigación.....	05
1.5. Delimitación de la investigación	05
1.6. Limitaciones de la investigación	05
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	06
2.1. Antecedentes de la investigación	06
2.1.1. Nacionales	06
2.1.2. Internacionales.....	09
2.2. Bases teóricas	13

2.2.1. Miel de Abeja	13
2.2.1.2. Clasificación	15
2.2.1.3. Recolección y cosecha	16
2.2.1.4. Registro de Campo (Ubicación Geográfica).....	17
2.2.1.5. Características Organolépticas	18
2.2.1.6. Factores Físicos.....	19
2.2.1.7. Factores Químicos	20
2.2.1.8. Metabolitos Primarios y Secundarios	24
2.2.1.9. Actividad Antibacteriana.....	26
2.2.2. Propóleo.....	31
2.2.2.1. Historia.....	31
2.2.2.2. Etnobotánica	32
2.2.2.3. Sinonimia	33
2.2.2.4. Origen	33
2.2.2.5. Usos por la Colmena.....	34
2.2.2.6. Recolección	35
2.2.2.7. Métodos de Cosecha	36
2.2.2.8. Composición Química	39
2.2.2.9. Actividad Antibacteriana.....	43
2.3. Bases microbiológicas.....	45
2.3.1 Requerimiento para el Desarrollo Bacteriano.....	45
2.3.2 Factores Accesorios de Crecimiento.....	50
2.3.3 Medios de Cultivo.....	53
2.3.3.1. Clasificación	53
2.3.3.2. Preparación.....	59
2.3.3.3. Esterilización	60
2.3.4 Siembra y Aislamiento Bacteriano.....	62
2.3.5 Metabolismo Bacteriano	64
2.3.6 <i>Staphylococcus aureus</i>	66
2.3.6.1. Generalidades.....	66
2.3.6.2. Aislamiento e Identificación.....	67
2.3.7 <i>Escherichia coli</i>	68

2.3.7.1. Generalidades.....	68
2.3.7.2. Aislamiento e identificación.....	68
2.4. Formulación de hipótesis.....	69
2.4.1. Hipótesis general	69
2.4.2. Hipótesis específicas	69
2.5. Operacionalización de variables e indicadores	69
2.6. Definición de términos básicos.....	70
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA.....	73
3.1. Tipo y nivel de investigación.....	73
3.2. Diseño de la investigación.....	73
3.2.1. Material biológico	73
3.2.2. Materiales e instrumentos de laboratorio	73
3.2.3. Reactivos químicos	74
3.2.4. Estudio fitoquímico	75
3.2.5. Estudio macroscópico	75
3.3. Población y muestra de la investigación.....	76
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	77
3.4.1. Descripción de los instrumentos	77
3.4.2. Validación de instrumentos	78
3.5. Técnicas para el procesamiento de datos.....	78
3.6. Procedimiento experimental.....	79
3.6.1. Obtención de los Nutrientes.....	79
3.6.2. Solubilidad y análisis de compuestos químicos (metabolitos).....	79
3.6.3. Reactivación de las bacterias.....	80
3.6.4. Siembra y aislamiento.....	81
CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	82
4.1 Presentación de resultados	82
4.2 Contrastación de hipótesis	88

4.3 Discusión de resultados	90
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	93
5.1 Conclusiones.....	93
5.2 Recomendaciones.....	94
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
ANEXOS	102

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 01: Matriz de consistencia	103
Anexo N° 02: Testimonio fotográfico	104
Anexo N° 03: Certificado Cepas ATCC	111
Anexo N° 04: Cepas bacterianas aisladas de pacientes	113
Anexo N° 05: Validación del instrumento.....	114
Anexo N° 06: Esterilización y preparación de medios de cultivo	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 01: Aislamiento.....	89
Figura N° 02: Visualización de la morfología de la colonia bacteriana	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 01: Composición Química Promedio de la Miel	22
Tabla N° 02: Composición Química Promedio de la Miel	22
Tabla N° 03: Composición Química Promedio de la Miel	23
Tabla N° 04: Composición Química Promedio de la Miel	23
Tabla N° 05: Tamizaje Fitoquímico de la Miel de <i>Apis mellífera</i>	25
Tabla N° 06: Carbohidratos de la Miel de <i>Apis mellífera</i>	25
Tabla N° 07: Identificación de Metabolitos Primarios.....	25
Tabla N° 08: Clasificación Nutricional de los Microorganismos	47
Tabla N° 09: Operacionalización de Variables	69
Tabla N° 10: Resumen de Resultados de Juicios de Expertos.....	78
Tabla N° 11: Determinación de Metabolitos	80
Tabla N° 12: Prueba de Solubilidad.....	82
Tabla N° 13: Identificación de Metabolitos.....	82
Tabla N° 13: Identificación de metabolitos (Continuación)	83
Tabla N° 14: Número de placas Petri obtenidas según tipo de cepa y medio.....	84
Tabla N° 15: Estudio de los agares <i>Staphylococcus aureus</i> N° ATCC 25923.....	85
Tabla N° 16: Estudio de los agares <i>Escherichia coli</i> N° ATCC 8739	85
Tabla N° 17: Cantidad de agares obtenidos según tipo de cepa de paciente y medio.....	86
Tabla N° 18: Estudio de los agares <i>Staphylococcus aureus</i>	87
Tabla N° 19: Estudio de los agares <i>Escherichia coli</i>	87

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar si el uso de la Miel y Propóleo de *Apis mellifera* (Abeja) del Agar FLYM en la detección de contaminantes bacterianos es buena. La Miel y Propóleo, se recolectaron en la Comunidad Campesina de Pargay que se encuentra ubicada en el Distrito de Chuquibambilla de la Provincia de Grau, Departamento y Región de Apurímac. Ambas muestras presentaron mayor solubilidad en agua y etanol y en ellos se encontraron metabolitos como alcaloides, triterpenoides, glicósidos y carbohidratos en la miel de abeja y compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, taninos y glicósidos en el propóleo.

Se realizaron 80 cultivos, 40 con *Staphylococcus aureus* ATCC N° 25923 y 40 con *Escherichia coli* ATCC 8739, de las cuales se cultivaron 20 con Miel de Abeja (3%), 20 con Propóleo (1.5%), 20 con Miel de Abeja (3%) más Propóleo (1.5%) del Agar FLYM y 20 con Agar nutritivo que fue tomada como medio de cultivo patrón o *gold standard*.

En la evaluación macroscópica con Miel de Abeja (3%) más Propóleo (1.5%) del Agar FLYM se consideraron dos criterios de evaluación: aislamiento y visualización de la morfología de la colonia bacteriana; para ambas cepas ATCC se obtuvo un calificativo de 90% (bueno) y 10% (regular) y para el Agar nutritivo 100% del calificativo (bueno).

Se arribó a la conclusión de que el uso de la Miel y Propóleo de *Apis mellifera* (Abeja) del Agar FLYM en la detección de contaminantes bacterianos es buena.

Palabras Claves: Miel, Propóleo, Abeja, Agar, contaminantes bacterianos.

ABSTRACT

The objective of the present work was to determine if the use of Honey and Propolis of *Apis mellifera* (Bee) of the FLYM Agar in the detection of bacterial contaminants is good. Honey and Propolis, were collected in the Peasant Community of Pargay that is located in the District of Chuquibambilla of the Province of Grau, Department and Region of Apurimac. Both samples showed greater solubility in water and ethanol and in them were found metabolites such as alkaloids, triterpenoids, glycosides and carbohydrates in honey and phenolic compounds, flavonoids, alkaloids, tannins and glycosides in propolis.

There were 80 cultures, 40 with *Staphylococcus aureus* ATCC N°. 25923 and 40 with *Escherichia coli* ATCC 8739, of which 20 were cultivated with Honey (3%), 20 with Propolis (1.5%), 20 with Honey (3%) plus Propolis (1.5%) of the FLYM Agar and 20 with nutritive Agar that was taken as a standard culture medium or gold standard.

In the macroscopic evaluation with Bee Honey (3%) plus Propolis (1.5%) of the FLYM Agar, two evaluation criteria were considered: isolation and visualization of the morphology of the bacterial colony; for both ATCC strains a qualification of 90% (good) and 10% (regular) was obtained and for the nutritive Agar 100% of the qualifier (good).

It was concluded that the use of Honey and Propolis of *Apis mellifera* (Bee) of the FLYM Agar in the detection of bacterial contaminants is good.

Key Words: Miel, Propóleo, Abeja, Agar, contaminantes bacterianos.

INTRODUCCIÓN

En los Laboratorios de Microbiología se utilizan una serie de medios de cultivo que son utilizados para el aislamiento e identificación de bacterias, estos medios son fabricados por industrias farmacéuticas internacionales los cuales para ser empleados previamente deben ser reconstituidos con agua desionizada debido a que su presentación se realiza en frascos liofilizados; posteriormente deben ser esterilizados en vapor saturado a presión y posteriormente mediante el uso de un asa de siembra se realiza la inoculación en los mismos para el aislamiento y visualización de la morfología de las colonias bacterianas. ^(21, 35). Asimismo en la actualidad se buscan alternativas utilizando productos naturales que puedan formar parte de la composición química y que brinden equivalente o idéntico resultado en los laboratorios de bacteriología. ^(51, 63).

La Miel de Abeja posee un gran valor nutricional, en ella se presenta azúcares reductores, carbohidratos totales 82 a 95%, fructosa 28 a 44%, glucosa 22 a 38%, sacarosa 0,2 a 5%, maltosa 2 a 16%, otros azúcares 0,1 a 8%; y otros metabolitos presentes como esteroides, flavonoides, leucoantocianidinas y compuestos fenólicos. ^(38, 63). Asimismo, al Propóleo elaborado por *Apis mellífera*, se le han atribuido los siguientes grupos químicos ^(04, 07): aldehídos, ácidos y ésteres alifáticos, aminoácidos, ácidos y ésteres aromáticos, chalconas y dihidrochalconas, flavanonas, flavonas, flavonoides, ácidos grasos, cetonas, terpenoides, esteroides y azúcares; ambas muestras biológicas poseen metabolitos, los cuales pueden servir de base para la formulación y preparación de un medio de cultivo para la determinación de contaminantes bacterianos. ^(32, 33).

En la presente investigación, se pretende determinar si el efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellífera* del Agar FLYM en la detección de contaminantes bacterianos es buena; asimismo se desea brindar bases científicas para ser utilizado para el aislamiento y visualización de la morfología de la colonia bacteriana.

La presente investigación expone el procedimiento científico metodológico seguido el cual está estructurado en cinco capítulos, a saber:

En el primer capítulo se desarrolla el planteamiento del problema, la justificación, los objetivos y las limitaciones de la investigación.

En el segundo capítulo describe el marco teórico: los antecedentes y las bases teóricas, las variables, la formulación de las hipótesis y la definición de los términos básicos.

En el tercer capítulo plantea la metodología que considera el tipo y diseño de la investigación, la población y la muestra, las técnicas de recolección y procesamiento de los datos, así como el procedimiento experimental.

El cuarto capítulo se muestra el análisis y discusión de los resultados.

El quinto capítulo plantea las conclusiones y recomendaciones.

Finalmente, se dan a conocer las referencias bibliográficas y los anexos.

CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la realidad problemática

La miel de *Apis Mellífera* es reconocida por sus propiedades medicinales desde la antigüedad: como tratamiento terapéutico contra infecciones provocadas por bacterias y hongos, en heridas, úlceras, quemaduras e infecciones oculares. (47, 49). Diversos autores han validado que sus propiedades antibacterianas se deben en parte al alto contenido de azúcares (El cual hace que el agua no esté disponible para los microorganismos, deshidrata la célula bacteriana e inhiba la división celular), su bajo pH, la presencia de peróxido de hidrógeno y algunos componentes fitoquímicos específicos de las diferentes especies de plantas, las cuales le transfieren sus cualidades al néctar recolectado por la *Apis Mellífera* (Abeja). (34, 36, 40).

El Propóleo de *Apis mellífera*, es una resina cerosa y pegajosa, de composición compleja y de consistencia viscosa, que las abejas elaboran y utilizan en la construcción, reparación, aislamiento y protección de la colmena. Es extraído a partir de exudados vegetales y mezclado con sustancias salivales de las abejas. (10, 12, 13). En general, revisiones sobre la composición química del Propóleo dan cuenta de los siguientes grupos: aldehídos, ácidos y ésteres alifáticos, aminoácidos, ácidos y ésteres aromáticos, chalconas y dihidrochalconas, flavanonas, flavonas, flavonoides, ácidos grasos, cetonas, terpenoides, esteroides y azúcares. Asimismo los fenoles constituyen más del 50% del peso. Su composición compleja en conjunto serían los responsables del efecto inhibitorio sobre las bacterias. (39, 43,45).

Teniendo en cuenta la sinergia entre los metabolitos primarios y secundarios de la miel de abeja y propóleo de *Apis mellífera*, surge la idea de utilizarlos como base para la preparación de un medio de cultivo denominado Agar FLYM con la finalidad de utilizarlo para detectar contaminantes bacterianos, además de ser una alternativa natural, factible de conseguir y en relación al precio del insumo es muy cómodo.

1.2. Identificación y formulación del problema

1.2.1. Problema general:

1. ¿Cuál será el efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellífera* del Agar FLYM en la detección de contaminantes bacterianos?

1.2.2. Problemas específicos:

1. ¿Cuál será la composición química de la Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellífera*?
2. ¿Cuál será el efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellífera* del Agar FLYM en la detección de *Staphylococcus aureus*?
3. ¿Cuál será el efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellífera* del Agar FLYM en la detección de *Escherichia coli*?

1.3. Objetivos de la investigación.

1.3.1. Objetivo general:

1. Determinar el efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellífera* del Agar FLYM en la detección de contaminantes bacterianos.

1.3.2. Objetivos específicos:

1. Determinar la composición química de la Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellífera*.
2. Evaluar el efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellífera* del Agar FLYM en la detección de *Staphylococcus aureus*.
3. Evaluar el efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellífera* del Agar FLYM en la detección de *Escherichia coli*.

1.4. Justificación y viabilidad de la investigación

Cada día aparecen nuevos medios de cultivo artificiales que apoyan a los laboratoristas en la detección de contaminantes bacterianos. Uno de estos medios es el Agar Nutritivo, el cual no contiene inhibidores ni indicadores de pH. Las bacterias poco exigentes como la *Escherichia coli* y el *Staphylococcus aureus* desarrollan plenamente en este medio. Dentro de su composición nutricional presenta pluripeptona y extracto de carne, los cuales constituyen la fuente de carbono, nitrógeno y aportan nutrientes para el crecimiento bacteriano. La adición de cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar - agar es el agente gelificante. (56, 59, 63, 65, 67).

En nuestro país, el Agar Nutritivo se encuentra fabricado bajo la forma de polvo liofilizado al que es necesario rehidratar con agua. Su elaboración no se realiza en el Perú debido a los altos costos de los insumos empleados. Por ello, se deben implementar alternativas teniendo en cuenta productos naturales económicos, fácil de conseguir y que puedan brindar resultados parecidos. (63, 68). En la presente investigación, se busca elaborar un medio de cultivo denominado Agar FLYM a base de Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellifera* a fin de que la sinergia entre sus nutrientes, permita la detección de contaminantes bacterianos, además de ser una alternativa natural, fácil de conseguir y en relación al precio del insumo es muy económico.

1.5. Delimitación de la investigación

Ámbito Geográfico: El presente estudio se realizará en la Universidad Inca Garcilaso de la Vega en los Laboratorios de Microbiología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica.

Ámbito Temporal: El estudio corresponde al Año Académico 2017 - 2018.

1.6. Limitaciones de la investigación

El presupuesto se limita solo a estudiar al *Staphylococcus aureus* y a la *Escherichia coli*, por el elevado costo de los materiales.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la Investigación

2.1.1. Nacionales

Bautista R. (2011), presentó el estudio titulado “Efecto Antibacteriano de la Miel de Abeja en diferentes concentraciones sobre el *Streptococo mutans*”. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto antibacteriano de la miel de abeja en diferentes concentraciones sobre el *Streptococos mutans*. Se utilizó 50 placas petri con *Streptococo mutans* a las que se les aplicó miel de abeja en concentraciones de 5%, 10%, 20%, 30% y 100%. Se dejó incubar por 24 horas a 37°C para luego observar el efecto antibacteriano midiendo el halo de inhibición (mm). ⁽²⁾. Al comparar el promedio de los halos de inhibición que se formó ante el *Streptococos 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 18.6 mm. La miel de abeja a una mayor concentración produce mayor efecto antibacteriano sobre el *Streptococo mutans*. ⁽²⁾.

Vélez L. et.al. (2018), presentaron el estudio titulado “Efecto inhibitorio in vitro de la miel de abeja sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* aisladas de heridas superficiales”. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto inhibitorio in vitro de la miel sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* aisladas de heridas superficiales. ⁽⁵⁾.

Se siguió la metodología del Manual de Procedimientos Bacteriológicos en Infecciones Intrahospitalarias - Instituto Nacional de Salud –Serie de Normas Técnicas N°28 y para la determinación del efecto inhibitorio in vitro de la miel de abeja se aplicó Método modificado de difusión de Kirby Bauer. ⁽⁵⁾.

La miel de abeja de algarrobo y de zapote y la miel de abeja multiflora a concentraciones de 50% y 100% tienen efecto inhibitorio in vitro sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* aisladas de heridas superficiales, siendo el efecto dependiente del tipo de miel y de la cepa probada y directamente proporcional a la concentración. ⁽⁵⁾.

Castro E. (2017), presentó el estudio titulado “Efecto antibacteriano de miel de *Apis mellifera* y algarrobina de *Prosopis pallida* sobre coliformes en quesillos preparados artesanalmente expendidos en el mercado “La Unión” - Trujillo”. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto antibacteriano de la miel de *Apis mellifera* y la algarrobina de *Prosopis pallida* sobre los coliformes presentes en quesillos preparados artesanalmente expendidos en el mercado “La Unión” de Trujillo, Perú. ⁽⁶⁾.

Se establecieron 3 grupos para miel de abejas y 3 para algarrobina. Se agregó 50µL, 100µL y 150µL de miel de abejas por cada gramo de quesillo, a cada uno de los tres grupos. De forma similar, se procedió para la algarrobina, además, se trabajó con un grupo testigo al cual no se le adicionó nada. Después de 20 minutos de acción de las dos sustancias, se realizó la detección de coliformes mediante el método del número más probable (NMP). Los resultados indican que la miel de abejas tiene actividad antibacteriana contra coliformes a 100µL/g y 150µL/g, mientras que la algarrobina lo hace en las 3 concentraciones, pero tiene efecto total a 100µL/g y 150µL/g. ⁽⁶⁾.

Se concluye que tanto la miel de abeja como la algarrobina presentan efecto antibacteriano sobre los coliformes, siendo mayor el efecto de la algarrobina que actúa a concentraciones menores que la miel de abejas. ⁽⁶⁾.

Jara R. (2014), presentó el estudio titulado “Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de cinco propóleos peruanos sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556)”. ⁽⁴⁾.

El objetivo de este trabajo fue evaluar in vitro el efecto antibacteriano de cinco propóleos peruanos sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). ⁽⁴⁾.

Se comparó el efecto antibacteriano de cuatro marcas comerciales de propóleo Tintura de propóleo Farmagel, Tintura de propóleo Max, Madre Natura, Kaita® y un extracto metanólico de propóleo de Oxapampa y como control (+) la clorhexidina al 0.12%. ⁽⁴⁾.

El extracto metanólico de propóleo de Oxapampa presentó halos de inhibición de mayor tamaño con una media de 33.15 + 3.26 mm frente a las cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), para el *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) su media fue de 23.23 + 0.82 mm. En el caso de los 4 extractos de propóleo comerciales, sólo 3 de ellos (Tintura de propóleo Farmagel, Madre Natura y Kaita®), tuvieron actividad antibacteriana frente a las cepas estudiadas, en todos los casos la actividad antibacteriana es menor que el control (+). ⁽⁴⁾.

El extracto metanólico de propóleo de Oxapampa tiene mayor actividad antibacteriana que los extractos comerciales frente a las cepas *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). ⁽⁴⁾.

Álvarez M. (2014), presentó el estudio titulado “Efecto Antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Propolis de *Apis mellífera* (Propóleo) frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212”. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Propolis de *Apis mellífera* “Propóleo” frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. ⁽⁷⁾.

El efecto antibacteriano del Propóleo de *Apis mellífera* se determinó a través de la concentración mínima bacteriana (CMB), y la susceptibilidad bacteriana. ⁽⁷⁾.

Los resultados nos permiten concluir que el extracto etanólico de Propolis de *Apis mellífera* “Propóleo” posee efecto antibacteriano in vitro frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, siendo la diferencia estadísticamente significativa entre la concentración al 25% con 75% ($p=0.024$) y 25% con 100% ($p=0.025$), más no con la concentración al 50%. En la susceptibilidad bacteriana se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones al 25% con las otras tres concentraciones evaluadas, más no se observaron diferencias entre estas últimas. ⁽⁷⁾.

Aquino W. et.al. (2015), presentaron el estudio titulado “Efecto bactericida del extracto hidroalcohólico de Propóleos en bacterias gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y gram negativa (*Salmonella typhi*) a diferentes concentraciones”. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto bactericida del Propóleos en la zona de Acobamba - Tarma, en bacterias gram positivas y negativas más representativas. ⁽¹⁰⁾.

Se utilizó la metodología de sensibilidad Microbiana: Difusión en Agar del extracto hidroalcohólico de propóleos en bacterias Gram positivas y Gram negativas. Se determinó que el tratamiento de 20% de concentración del extracto hidroalcohólico de propóleos tiene mayor efecto bactericida sobre el microorganismo *Staphylococcus aureus*, con un mayor halo de 2,6 cm. Mas no así sobre el microorganismos *Salmonella typhi*, donde no se apreció un mayor efecto que el mínimo apreciado en las 3 tratamientos sin diferencias significativas entre ellas. ⁽¹⁰⁾.

2.1.2. Internacionales

Becerra D. et.al. (2016), presentaron el estudio titulado “Efecto antibacteriano de la miel de abeja en diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus*”. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antibacteriana de la miel de abeja en sus diferentes concentraciones frente al *Staphylococcus aureus*. ⁽¹¹⁾.

El estudio se basó en la utilización de 6 cultivos de *Staphylococcus aureus* en caldo nutritivo con una determinadas cantidad de colonias a las cuales se aplicó miel de abeja en concentraciones de 30%, 60% y 100% que se dejó incubar por 24 hora para luego observar el efecto antibacteriano a través de un cultivo en agar sangre en otras 24 hrs. ⁽¹¹⁾.

Se comprobó que la actividad bactericida de la miel frente al *Staphylococcus aureus* es muy efectiva siendo esta una alternativa de tratamiento frente a dicha bacteria y se pudo constatar que la miel de abeja a una mayor concentración produce mayor efecto antibacteriano sobre el *Staphylococcus aureus*. ⁽¹¹⁾.

Talero C. (2014), presentó el estudio titulado “Actividad anti-gérmenes in vitro de extractos etanólico de propóleos obtenido de abejas (*Apis mellífera*) en tres áreas geográficas de Colombia”. El objetivo de este trabajo fue cualificar la actividad biológica in vitro de propóleos de abejas *Apis mellífera*, se buscó correlacionar el origen geográfico y la actividad antimicrobiana, como un aporte para la denominación de origen del producto apícola. Se estableció el comportamiento del propóleo en cuanto a su capacidad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus lúteus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella entérica* considerando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). ⁽¹³⁾.

Los propóleos llevados a extractos etanólico con el empleo del disolvente etanol al 70% y 96% presentaron actividad frente a todas las cepas bacteriana en concentraciones de 3,2 a 0,1 mg/ml, con especial actividad frente a *Klebsiella* y *B. subtilis*. ⁽¹³⁾.

Galarza L. (2013), presentó el estudio titulado “Determinación del poder antibiótico in vitro del extracto etanólico del propóleo sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* presentes en metritis puerperal bovina”. ⁽¹⁴⁾.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antibiótica in vitro del Extracto Etanólico del Propóleo (EEP) como alternativa natural para combatir a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Se elaboraron los Extractos Etanólicos de Propóleo al 10% y 30%; los propóleos fueron recolectados de apiarios de la zona y procesados en el laboratorio clínico de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca; para el antibiograma se utilizó una concentración de bacterias ajustada a la escala de Mc. Farland 0.5 y empleando el agar Muller Hinton; para el efecto se usaron sensidiscos de Amoxicilina y Ácido Clavulánico, sensidiscos de EEP al 10% y 30%, y como control el alcohol etílico de 96°. ⁽¹⁴⁾.

Se demostró que el propóleo no tiene ningún efecto sobre la *Escherichia coli*, ya que los resultados de las medidas de los halos de inhibición fueron iguales a cero. Asimismo el propóleo generó resultados positivos al trabajar sobre *Staphylococcus aureus*. ⁽¹⁴⁾.

Mayta - Tovalino F. et.al. (2009), presentó el estudio titulado “Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa – Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)”. El objetivo de este trabajo fue demostrar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo (EEP) de Oxapampa-Perú evaluando in vitro su acción antibacteriana frente al *S. mutans* y *S. aureus* para enfrentarlas a las soluciones: Propóleo 10% y 30% y compararlas con los testigos clorhexidina 0,12 y 0,05%, listerine® y agua destilada. ⁽⁴³⁾.

Se evaluó la actividad antimicrobiana mediante el método de Kirby-Bauer. El diseño del estudio fue de tipo experimental in vitro y el tamaño muestral fue 16. Se determinó que para el *S. aureus*, el EEP al 30% presentó mayor eficacia con una media de 11,77mm±0,19 y se encontró que las dos concentraciones de propóleo a las 24 y 48 horas mostraron diferencia significativa $p=0,007$. ⁽⁴³⁾.

Además, se determinó que para el *S. mutans*, tanto el EEP al 10% y 30% a las 24 y 48 horas no mostraron diferencia significativa. Se concluyó que el EEP al 30% tuvo mayor efecto antibacteriano que el Listerine® contra el *S. mutans* $p < 0,001$ e igual en efectividad que la clorhexidina 0,05% frente al *S. aureus*.⁽⁴³⁾

Vega – Oliveros C. et.al. (2014), presentaron el estudio titulado “Actividad Antimicrobiana de Mieles de *Apis mellífera* de la Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia”. El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de 33 muestras de miel de *Apis mellífera*, obtenida en las zonas cafetaleras de la Sierra Nevada de santa Marta.⁽²⁸⁾

Se sembraron cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922 en agar TSA ($35 \pm 2^\circ\text{C}$ - 24 horas). Se preparó el inóculo en agua peptonada estéril (APE) 0.1% utilizando el patrón Mc Farland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC). Se evaluó la actividad antimicrobiana en 33 muestras de miel. Cada una se diluyó al 80% (3,2 g miel) con 0,8 g de agua destilada estéril (ADE), o con solución catalasa de hígado de bovino liofilizada (2 mg/mL, Sigma-Aldrich) para la actividad no peróxido. La CMI se evaluó en 4 muestras con 60 días de almacenamiento, tomando miel al 80, 60 (2,4 g), 40 (1,6) y 20% (0,8 g), completando 4 g con ADE.⁽²⁸⁾

Se evidenció actividad antimicrobiana en mieles de *Apis mellífera* enfrentadas con las dos bacterias utilizadas. La capacidad de inhibición fue mayor contra *S. aureus*. Se determinó que el factor de inhibición de estas mieles es el peróxido de hidrógeno y que esta propiedad se pierde en el tiempo, también se observó que la CMI de las mieles analizadas fue del 40% con un almacenaje de 60 días.⁽²⁸⁾

Vayas B. (2017), presentó el estudio titulado “Evaluación de métodos de sensibilidad en la efectividad antimicrobiana de la miel de abeja sobre cepa certificada de (*Staphylococcus aureus*)”.⁽²⁹⁾

El objetivo del presente estudio fue evaluar dos métodos de sensibilidad Kirby - Bauer y Método en pozos modificados de agar sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 11632 mediante la utilización de miel de abeja pura de *Apis mellífera*.⁽²⁹⁾

Como resultado a través del análisis estadístico T de student se obtuvo que el método modificado en pozos de agar formó halos de inhibición en promedio de 25,04 mm, mientras que en el método Kirby Bauer presentó 21,15 mm. Se concluyó que el método modificado en pozos de agar es más sensible que Kirby Bauer. Asimismo se determinó mediante el análisis bioquímico, que la miel de abeja contiene alcaloides, compuestos de agrupamiento lactónico, terpenos, azúcares reductores y saponinas componentes bioactivos que son atribuidos a propiedades antibacterianas.⁽²⁹⁾

2.2. Bases Teóricas.

2.2.1. Miel de Abeja

Las abejas mellíferas son insectos del orden de los Himenópteros, de familia de los Ápidos y del género Ápis y algunas de sus especies son: *Apis mellífera*, *Apis florea*, *Apis indica*, *Apis dorsata*. La *Apis mellífera* ocupa toda la Zona Europea y Norteamérica, como consecuencia del comercio de abejas también las encontramos en Sudamérica, En el Perú la más importante en la producción de miel es la *Apis mellífera*. La abeja mellífera o abeja de miel, abeja social, produce la miel a partir del néctar.⁽³⁰⁾

El néctar es una secreción azucarada con un 80% de agua, este néctar tiene glucosa, fructosa y otros azúcares y sales minerales. Es un recurso que ofrecen las flores a cambio de obtener un beneficio como puede ser la polinización de las flores con la ayuda de las abejas.⁽³¹⁾

El néctar es recogido por la abeja y almacenado en el buche melario, se mezcla en el buche con sustancias salivares y transportado a la colmena.⁽³⁰⁾

La miel de abeja es una solución sobresaturada de azúcares, y una de las mezclas de carbohidratos más complejas producidas en la naturaleza. Contiene además pequeñas cantidades de ácidos orgánicos, aminoácidos, minerales, vitaminas, compuestos fenólicos y compuestos volátiles. Es dulce elaborada a partir del néctar de las flores, las cuales recogen, combinan con sustancias específicas, la transforman y almacenan en el panal, para luego utilizarse como alimento energético. La transformación de néctar a miel se produce debido a cambios físicos y químicos. ⁽³¹⁾.

Los primeros se deben principalmente a un proceso de evaporación, en el cual, el néctar pierde hasta una tercera parte de su contenido de humedad durante su almacenamiento en la colmena, y los segundos se deben a la acción de enzimas que las obreras adicionan al néctar, como es la invertasa (Sacarasa), la cual hidroliza la sacarosa en glucosa y fructosa. ⁽³¹⁾.

2.2.1.1. Historia

El desarrollo de las sociedades humanas se ha sustentado en el aprovechamiento de los recursos naturales como en el caso de la miel de abeja, la cual se produjo mucho antes de la aparición del hombre. Aunque la historia de la apicultura tiene sus raíces en los primeros asentamientos humanos, existen evidencias arqueológicas de que la miel de abeja bien pudo utilizarse como alimento desde el periodo Mesolítico, esto es 7000 años a.c. También se sabe que la primera referencia escrita para la miel es una tablilla Sumeriana, fechada entre los años 2100-2000 a.c.; dicha tablilla también menciona el uso de la miel como droga y como ungüento. ^(28, 33).

Por ello se afirma que la miel ha sido usada con propósitos médicos y nutricionales. Se estima que la miel es la medicina más antigua conocida y que en muchas civilizaciones fue prescrita por médicos para una variedad de enfermedades. ^(01, 33).

Los antiguos egipcios, asirios, chinos y romanos usaron la miel en combinación con otras hierbas para tratar heridas y enfermedades del intestino. En la Grecia antigua, Aristóteles afirmaba que la miel podría aplicarse como un ungüento para las heridas y el dolor de ojos. Dioscórides alrededor del año 50 d.c. recomendaba a la miel para el tratamiento de quemaduras del sol, manchas en la cara y heridas ulcerosas. En la sociedad Inca, la miel y la cera eran elementos que preservan la vida, considerado como un regalo de los APUS, su nombre era MAPA MAMA, cuya traducción es “Aceite o Cera de la Madre”. Era considerado como un manjar para el paladar exquisito y alimento natural para el cuerpo. ^(34, 37).

2.2.1.2. Clasificación

La clasificación de las mieles: ^(36, 38).

a) Según su origen botánico:

1- Miel de flores o miel de néctar: es la miel que procede del néctar de las flores y se distinguen:

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

2- Miel de mielada o mielato: es la miel que procede en su mayor parte de excreciones de insectos chupadores de plantas (hemípteros) presentes en las partes vivas de las plantas.

b) Según su elaboración o su presentación:

1- Miel en panal: es la miel depositada por las abejas en los alvéolos operculados del panal, elaborados por las propias abejas o estirados a partir de láminas de cera comerciales por las propias abejas.

- 2- Miel con trozos de panal o panal cortado en miel: es la miel que contiene uno o más trozos de miel en panal.
- 3- Miel escurrida: es la miel que se obtiene mediante el escurrido de los panales desoperculados, sin larvas.
- 4- Miel centrifugada: es la miel que se obtiene mediante la centrifugación de los panales desoperculados, sin larvas.

- 5- Miel prensada: es la miel obtenida mediante la compresión de los panales, sin larvas, con o sin aplicación de calor moderado, de hasta un máximo de 45 °C.
- 6- Miel filtrada: se obtiene eliminando mediante un proceso de filtración, materia orgánica o inorgánica ajena a la miel de manera tal que se genere una importante eliminación de polen.
- 7- Miel para uso industrial: apropiada para usos industriales o para su utilización como ingrediente de otros productos alimenticios y/o similar que se elaboran ulteriormente, puede; presentar un sabor o un olor extraños, o haber comenzado a fermentar, o haber fermentado, o haberse sobrecalentado. ^(36,38).

2.2.1.3. Recolección y Cosecha

Recolección:

- 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. ⁽³⁷⁾.

- Área de cosecha: se realiza en un área cerrada a fin de garantizar un aislamiento con el ambiente, previniendo la entrada de abejas y plagas, con protección contra el polvo y garantizar la limpieza. ⁽³⁷⁾.

- 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. Esta miel para que mantenga su calidad deberá obtenerse por gravedad o escurrida. ⁽³⁸⁾.
- 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. ⁽³⁸⁾.

Cosecha ⁽³⁸⁾.

- Miel escurrida: Es la miel obtenida por escurrimiento de los panales desoperculados, sin larvas.
- Miel prensada: Es la miel obtenida por prensado de los panales sin larvas.
- Miel centrifugada: Es la miel obtenida por centrifugación de los panales desoperculados, sin larvas.
- Miel filtrada: Es la que ha sido sometida a un proceso de filtración sin alterar su valor nutritivo.

2.2.1.4. Registro de Campo (Ubicación Geográfica)

La Miel de Abeja utilizada en la experimentación es de tipo multifloral y fue recolectada junto con el Propóleo en la Comunidad Campesina de “Pargay” que se encuentra ubicada en el Distrito de Chuquibambilla de la Provincia de Grau, Departamento y Región Apurímac.

En esta área geográfica predomina la actividad agrícola, se presenta una diversidad de recursos vegetales medicinales de manera silvestre y también cultivable, con diferentes propiedades curativas y usos. Entre ellos Eucalipto, Huamanpinta (*Chuquiraga spinose*), Chachacoma (*Senecio oreophyton*), Muña, Molle, etc. y diversa variedad de flora silvestre, hábitat ideal para que las abejas puedan elaborar miel de alta calidad.

2.2.1.5. Características Organolépticas

La miel es un producto biológico de composición compleja y diversa, variando sus caracteres en función de la procedencia, las plantas que han proporcionado el néctar, el procedimiento de extracción, etc. ⁽⁴⁷⁾.

- a) Color: varía desde clara hasta parda oscura, pasando por varias tonalidades del amarillo y del ámbar, pero siendo uniforme en todo el volumen del envase que la contenga. La miel de color claro es más rica en vitamina A y las mieles oscuras son más ricas en vitaminas, B1 y C. ⁽⁴⁷⁾.
- b) Sabor: característico a su origen o procedencia botánica. Es marcadamente dulce. En general, el sabor de las mieles de color claro es más suave que el de las mieles de color oscuro, que lo tienen más intenso. Independientemente de su color, la miel puede ser más o menos dulce, a veces, picante y, en algunos casos, extremadamente amarga, hasta el extremo de no poder consumirse. ⁽⁴⁷⁾.
- c) Olor: característico a su origen o procedencia botánica. Depende de la planta en que las abejas han recogido el néctar, así, las mieles monoflorales tienen el olor característico de la planta de que proceden. ⁽⁴⁷⁾.

- d) Consistencia: fluida, viscosa o cristalizada total o parcialmente. Recién extraída presenta un aspecto casi líquido, como corresponde a una solución acuosa concentrada, más o menos fluida, y su consistencia aumenta con el tiempo; antes de un año de su extracción suele presentar un aspecto granuloso y se transforma en una masa pastosa, granulada y opaca. ⁽⁴⁷⁾.

2.2.1.6. Factores Físicos

Dependiendo de la especie vegetal, de la cual las abejas recolectan néctar, le corresponde una miel distinta, tanto en lo que concierne al aroma como al color, ambos debido a diferencias en la composición química del néctar original. Asimismo diversos estudios indican que la viscosidad y el color de la miel son sus características físicas más estudiadas. ⁽⁴⁹⁾.

- a) Color: Es una propiedad óptica que resulta de los diversos grados de absorción de luz de ciertos pigmentos y otras sustancias desconocidas que se encuentran en la miel de abeja. ⁽⁴⁹⁾.
- b) Cristalización: Es un estado de las mieles, se presenta cuando los azúcares de la miel que se encuentran en exceso son liberados en forma de cristales, este proceso depende no solo del origen floral, sino también del procesamiento y almacenamiento. ⁽⁴⁹⁾.
- c) Índice de refracción: se utiliza para determinar de manera rápida y precisa la humedad de la miel. ⁽⁴⁹⁾.
- d) Viscosidad: La miel en estado líquido suele ser muy viscosa, esta propiedad depende de su composición química, contenido de agua y temperatura. La baja viscosidad puede indicar adulteración por adición de agua. ⁽⁴⁹⁾.
- 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. ⁽⁴⁹⁾.

La densidad disminuye linealmente mientras la temperatura o el contenido de agua aumenta, y aumenta linealmente con un aumento del contenido de sólidos. ⁽⁴⁹⁾.

- f) Conductividad eléctrica: Sirve para diferenciar la miel de néctar de la miel de mielada que es más rica en sales. ⁽⁴⁹⁾.
- g) Higroscopicidad: Está en relación con la humedad. ⁽⁴⁹⁾.
- h) Rotación óptica: Parámetro utilizado para diferenciar la miel de néctar (Levógira) de la miel de mielada (Dextrógira). ⁽⁴⁹⁾.

2.2.1.7. Factores Químicos

El comportamiento químico de la miel de abeja se debe particularmente a la glucosa y fructosa. Su composición permite evaluar su calidad con base en su contenido de agua, azúcares, acidez, cenizas, enzimas, nitrógeno, hidroximetilfurfural y sustancias insolubles. ^(27, 31).

- Humedad: El contenido de agua de las mieles es una de las características más importantes porque determina su grado de conservación. ^(27, 31).
- La humedad de la miel puede aumentar durante su extracción y almacenamiento debido a sus propiedades higroscópicas. Este factor debe tomarse en cuenta en el almacenamiento; cuando el producto es almacenado a temperaturas bajas 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. ^(27, 31).

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. ^(27, 31).

- 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⁾
- Acidez: Suele ser más elevada en mieles fermentadas, la acidez libre no debe superar los 40 miliequivalentes por kilogramo. Los valores promedio de pH normales para una miel se encuentran comprendidos entre 3.0 y 4.5 debido a la presencia de ácidos orgánicos. ⁽³⁵⁾
- 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⁾
- 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 polisacárido almidón en glucosa, es muy sensible (termolábil) y las técnicas analíticas para determinarla son muy sencillas, por lo que su ausencia indica calentamiento y/o envejecimiento de la miel. ⁽³⁷⁾
- Nitrógeno: El contenido de compuestos nitrogenados como proteínas, péptidos y aminoácidos en la miel es muy bajo y se asocia con la presencia de granos de polen, por lo que su detección se ha utilizado como indicador para detectar adulteraciones en mieles comerciales. ⁽⁴⁰⁾
- Hidroximetilfurfural (HMF): 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, por lo que se utiliza como indicador de calentamiento y envejecimiento de la miel. ⁽⁴⁰⁾

- Sustancias insolubles: Son materias extrañas como la cera, el propóleo, los granos de arena, algunas partes del cuerpo de las abejas, entre otros, que se consideran impurezas, por lo que son indicadores de la calidad higiénica de la miel. ⁽³⁴⁾.

Las siguientes Tablas, muestran la composición química de diferentes mieles recolectadas de diversos ambientes y producidas por la *Apis mellífera*:

Tabla N° 01. Composición Química Promedio de la Miel

Componentes de la Miel	Promedio
Glucosa (%)	32.00
Sacarosa (%)	1.38
Maltosa (%)	6.80
Otros azúcares (%)	3.10
Humedad (%)	17.20
pH	3.91
Acidez Libre (meq/kg)	22.03
Lactona (meq/kg)	7.11
Acidez Total (meq/kg)	29.12
Cenizas (%)	0.17
Nitrógeno Total (%)	0.04
Índice de Diastasa	20.80

Fuente: Rey J. (2012). ⁽³⁴⁾

Tabla N° 02. Composición Química Promedio de la Miel

Componentes de la Miel	Promedio
Fructosa	38.20%
Glucosa	32.00%
Sacarosa	1.38%
Maltosa	6.80%
Otros azúcares	3.10%
Humedad	17.20%
pH	3.91
Acidez Libre	22.03 meq/kg.
Lactona	7.11 meq/kg.
Acidez Total	29.12 meq/kg.
Cenizas	0.17%
Nitrógeno Total	0.04%
Índice de Diastasa	20.80

Fuente: Rey J. (2012). ⁽³⁴⁾

Tabla N° 03. Composición Química Promedio de la Miel

Componentes de la Miel	Promedio
Agua.	17.7%
Glucosa.	34.02%
Levulosa.	40.50%
Sacarosa.	1.90%
Dextrinas.	1.51%
Cenizas.	0.18%
Levulosa.	41%
Glucosa.	34%
Sacarosa.	1.9%
Cenizas.	0.18%
Humedad 17 (%)	17%
Dextrina 1.8 (%)	1.8%
Proteína 0.3 (%)	0.3%
Acido	0.1%

Fuente: Rey J. (2012).⁽³⁴⁾

Tabla N° 04. Composición Química Promedio de la Miel

Nutriente	Cantidad Promedio en 100 g.
Agua	17.1 g.
Carbohidratos Totales	82.4 g.
Fructosa	38.5 g.
Glucosa	31.0 g.
Maltosa	7.20 g.
Sucrosa	1.50 g.
Proteínas, aminoácidos, vitaminas y minerales	0.50 g.
Energía	304 Kcal
Grasas (Lípidos)	0.0 g.
Colesterol	0.0 g.
Vitaminas	
Tiamina	<0.00 mg.
Rivoflavina	<0.06 mg.
Niacina	<0.36 mg.
Acido Pantoténico	<0.11 mg.
Piridoxina (BG)	<0.32 mg.
Acido Ascórbico	2.2 - 2.4 mg.
Minerales	
Calcio	4.4 – 9.20 mg.
Cobre	0.003-0.10 mg
Fierro	0.06-1.5 mg
Magnesio	1.2-3.50 mg
Manganeso	0.02-0.4 mg
Fósforo	1.9-6.30 mg
Potasio	13.2 - 16.8 mg
Sodio	0.0-7.6mg
Zinc	0.03-0.4 mg

Fuente: Rey J. (2012).⁽³⁴⁾

2.2.1.8. Metabolitos Primarios y Secundarios

Adrianzén J. et.al. (2017), presentaron el estudio titulado “Efecto in vitro de la miel de *Apis mellífera* frente a *Escherichia coli* y *Cándida albicans*. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto in vitro de la miel de *Apis mellífera* frente a *Escherichia coli* y *Cándida albicans*.⁽⁶¹⁾

La miel es considerada una sustancia dulce elaborada por *Apis mellífera*, o por diferentes sub-especies, a partir del néctar de las flores y de otras secreciones extraflorales, que las abejas liban, transportan, transforman, combinan con otras sustancias, deshidratan, concentran y almacenan en los panales. Desde el punto de vista de su composición es una solución de glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, proteínas, minerales, ácidos orgánicos, vitaminas y enzimas.⁽⁶¹⁾

La miel de *Apis mellífera*, contiene:

Carbohidratos (73 - 83%); constituyendo el principal componente, además de fructosa (30,9 - 44,3%), glucosa (22,9 - 40,8%), sacarosa (0,8 - 10%), maltosa (0,5 - 2,8%), isomaltosa (0,5 - 1,5%), furanosa (0,5 - 1,5%) y nigerosa (0,2 - 1,0%); agua (14,5 - 18,5%). Además contiene ácidos orgánicos (0,6%): glucónico (principal), acético, butírico, cítrico, fórmico (también presente en el veneno de las abejas), láctico, málico, piroglutámico y succínico. Estos ácidos confieren a la miel un pH entre 3,4 y 6,1. Además de ello también presenta compuestos nitrogenados (0,4%): proteínas (0,3%), aminoácidos (principalmente prolina) (0,05 - 0,1%) y enzimas (amilasa, glucooxidasa, diastasa, invertasa, etc.). Minerales (0,1%): se han encontrado, principalmente, potasio (0,05%), fósforo (0,005%), calcio (0,0048%), sodio (0,0029%), magnesio (0,002%). Sustancias volátiles como flavonoides antioxidantes y ácidos fenólicos, también vitaminas, lípidos y sustancias aromáticas. La composición química de la miel depende de las fuentes vegetales, del clima, del manejo de extracción y almacenamiento, entre otros.^(34, 61)

Tabla N° 05: Tamizaje Fitoquímico de la Miel de *Apis mellífera*

Extracto	Ensayo	Metabolitos Secundarios	Resultado
Diclorometano	Borntranger	Quinonas	-
Etanólico	Shinoda	Flavonoides	+++
	Tricloruro Férrico	Fenoles	+
	Gelatina	Taninos	-
	Dragendorff	Alcaloides	+
	Hager		+
	Mayer		+
	Wagner		+
Acuoso/Ácido	Dragendorff	Alcaloides	+
	Hager		+
	Mayer		+
	Wagner		+
Acuoso	Shinoda	Flavonoides	++
	Rosemheim	Leucoantocianidinas	+
	Gelatina	Taninos	-
	Espuma	Saponinas	+
	Tricloruro Férrico	Fenoles	+

Legenda: Fuente: (Adrianzén J. et.al. 2017). ^(8, 61).

Intensidad: (+): poca; (++): moderada; (+++): alta.

Identificación: (+): presencia; (-): ausencia.

Tabla N° 06: Carbohidratos de la Miel de *Apis mellífera* ^(8, 32).

Monosacáridos	Disacárido	Trisacáridos	Sacáridos complejos
Fructosa. Glucosa.	Gentibiosa. Isomaltosa. Maltosa. Maltulosa. Nigerosa. Palatinosa. Sacarosa. Turalosa.	Centosa. Eriosa. Isomaltotriosa. Isopanosa. Laminaritriosa. Maltotriosa. Melezitosa. Panosa.	Somaltopentosa. Somaltotetraosa.

Tabla N° 07: Identificación de metabolitos Primarios. ^(8, 38).

Técnica de Identificación	Metabolito Primario	Miel de abeja	
		Ma	Mb
Reacción de Fehling.	Azúcares Reductores	++	+
Reacción de Bial.	Pentosas	++	+
Reacción de Bertrand.	Pentosas	++	+
Reacción de Seliwanoff.	Cetosas	++	+
Reacción de Berg.	Aldosas	+	+

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

Mb: 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)

2.2.1.9. Actividad Antibacteriana.

La miel se ha utilizado a lo largo de la historia, en muchas civilizaciones y culturas antiguas, con fines alimentarios y medicinales. Las numerosas propiedades biológicas encontradas en la miel, la convierten en un producto complementario de la alimentación humana. Diversos investigadores han comprobado el poder antibacteriano de la miel, debido fundamentalmente a su alta concentración de azúcares, la presencia de peróxido de hidrógeno y a diversas sustancias (ácidos orgánicos, flavonoides, etc.).⁽²⁾

La miel se utiliza como cicatrizante para la curación de llagas y heridas. Asimismo también puede actuar como expectorante y calmante de la tos, ayudando a combatir infecciones, promoviendo la regeneración de las mucosas y mejorando el estado anímico general. Estas propiedades se deben fundamentalmente a la presencia de componentes volátiles (especialmente terpenos), azúcares y su poder antiséptico. Actualmente, entre sus propiedades más destacadas cabe destacar es la de ser fuente de antioxidantes naturales, una de las principales razones por las que su consumo es recomendado.⁽⁵⁾

Cook (2007) describe una serie de propiedades de la miel sobre la curación de las heridas: acción antimicrobiana, que estaría dada por la alta osmolaridad de la miel y principalmente, debido al efecto del peróxido de hidrógeno producido en forma lenta y sostenida por la enzima glucoxidasa, manteniendo un efecto antimicrobiano con una concentración 1.000 veces más alta que un antiséptico usado comúnmente, sin los efectos adversos sobre la cicatrización (Andrades, Sepúlveda, & González, 2002). La acidez de la miel y la acidificación local de la herida previene el efecto nocivo que produce el amoniaco resultante del metabolismo bacteriano, incluso permite una mejor cesión del oxígeno que transporta la hemoglobina.⁽⁶⁾

La miel tiene cierto poder desbridante del tejido necrótico. La alta osmolaridad que presenta la miel es debida a su elevada concentración de azúcares. Esto le permite extraer suero de los tejidos circundantes por ósmosis creando en la herida un medio ambiente húmedo que favorece la formación del tejido de granulación. Además se promueve el desbridamiento autolítico mediante la conversión del plasminógeno inactivo en la matriz de la herida a su forma activa, la cual es la mayor enzima proteolítica encontrada en la sangre; sería un efectivo desodorizante debido a la metabolización de la glucosa por parte de la bacteria, en preferencia al tejido necrótico, resultando en la producción de ácido láctico y no en los compuestos malolientes generados de la degradación de proteínas; estimularía la actividad antiinflamatoria en las células del cuerpo, mediante la proliferación de linfocitos B y T y la activación de los fagocitos con concentraciones de miel tan reducidas como un 1% (Subrahmanyam et al., 2001). También estimularía a los monocitos y la liberación de citoquinas, el factor de necrosis tumoral [TNF] alfa, interleuquina [IL] -1, e IL-6 (Cooper & Molan, 2002). Estos efectos rápidamente reducirían el dolor, el edema y el exudado y minimizarían la cicatrización hipertrófica. ^(11, 27, 28, 29, 31)

Efecto Osmótico

La miel es una solución saturada o súper saturada de azúcares, de los sólidos de la miel, el 84% es una mezcla de monosacáridos fructosa y glucosa, la fuerte interacción de éstas moléculas de azúcares con las moléculas de agua dejando muy pocas moléculas de agua disponibles para los microorganismos. Esta agua "libre" es lo que se mide como la actividad del agua (A_w): los valores medios para la miel han sido reportados como 0,562 y 0,58991, 0,572 y 0,60710 y 0,62117. Muchas especies de bacterias tienen su crecimiento completamente inhibido por el (A_w) estar en el intervalo 0,94 - 0,9960, 102 (Cooper & Molan, 2002). ⁽³²⁾

Peróxido de Hidrógeno

Se produce enzimáticamente en la miel. La enzima glucosa oxidasa se secreta de la glándula hipofaríngea de la abeja en el néctar para ayudar en la formación de miel del néctar (Al Somal, Coley, Molan, & Hancock, 1994). El ácido glucónico más agua sirve para preservar la miel. En la dilución de la miel, la actividad aumenta en un factor de 2500 a 50.000, dando así antisépticos de "liberación lenta" a un nivel, que es antibacteriano, pero no daña tisular (Al Somal, Coley, Molan, & Hancock, 1994). Los factores fitoquímicos han sido descritos como factores antibacterianos no peróxidos, que se cree que son muchos fenoles complejos y ácidos orgánicos a menudo, denominados flavonoides. Estos químicos complejos no se descomponen bajo el calor o la luz o afectados por la dilución de la miel. La evidencia más directa de la existencia de factores antibacterianos no peróxidos en la miel se observa en los informes de actividad que persisten en mieles tratadas con catalasa para eliminar la actividad de peróxido de hidrógeno (Willix, Molan, & Harfoot, 1992).^(33, 34, 37)

pH.

La miel es característicamente ácida con un pH entre 3,2 y 4,5, que es lo suficientemente bajo como para inhibir a muchos patógenos animales (Allen, Molan, & Reid, 1991). Los valores mínimos de pH para el crecimiento de algunas especies patógenas comunes son: *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*. Así, en la miel no diluida, la acidez es un factor antibacteriano significativo (Finch, 2002).⁽³⁸⁾

La actividad antibacteriana que presenta la miel se ha atribuido a algunos factores como la osmolaridad relacionada con su contenido de agua, su bajo pH y a los niveles de peróxido de hidrógeno.⁽³⁸⁾

Varios autores han resaltado la actividad antibacteriana de la miel de abeja, en este sentido, se han reportado sensibilidad de cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella dublin* y *Pseudomonas aeruginosa* a varios tipos de miel de abeja. ⁽³⁸⁾

El mecanismo de acción antibiótico de la miel hasta ahora se desconoce. No se sabe si interviene un único factor o actúan varios sinérgicamente dada la complejidad de su composición. Hasta ahora no se ha hallado cuál es el componente o componentes de la miel que actúan como antibiótico. Actualmente el poder bactericida y cicatrizante en las úlceras se atribuye a tres factores:

- pH ácido que inhibe el crecimiento bacteriano y, además, neutraliza el amonio procedente del metabolismo de las bacterias colonizantes de la úlcera y su consecuente toxicidad para los tejidos. ⁽³⁸⁾
- La hipertonicidad osmótica de la miel que atrae agua y deshidrata los microbios contribuyendo a su erradicación. A la vez mantiene un grado apropiado de humedad en la úlcera. ⁽³⁸⁾
- La liberación continua de pequeñas cantidades de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) proveniente de la transformación de la glucosa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno mediante la acción de la enzima glucosidasa presente en la miel. El H_2O_2 liberado en pequeñas cantidades resulta tóxico a las bacterias pero no a los tejidos. ⁽³⁸⁾

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. ⁽⁴⁷⁾

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. 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). ⁽⁴⁷⁾

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. 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. ⁽⁴⁷⁾

Una propiedad farmacológica de la miel, es su poder antimicrobiano. Dos grandes científicos de nombres Dold, Du y Dziao en el año de 1937, fueron los primeros en examinar el efecto antimicrobiano de la miel con detalle y bautizaron al principio responsable de tal efecto con el nombre Inhibina, la cual se describió como termolábil y fotosensible, de ahí que una miel excesivamente calentada o expuesta a la luz directa durante mucho tiempo pierda sus propiedades antisépticas. ⁽⁴⁷⁾

El poder antiséptico de la miel se debe, aparte de la alta concentración de azúcares y del poder antimicrobiano de ciertos ácidos orgánicos que posee a la formación de peróxido de hidrógeno, a partir de glucosa por la acción del complejo enzimático glucosa-oxidasa. ^(47, 49)

Los Fitoquímicos son sustancias que provienen de la floración visitada por la abeja para la colecta del néctar. Dentro de éste grupo están los ácidos, flavonoides, y otros metabolitos secundarios (Maidana, 2008), que presentan propiedades antioxidantes y antimicrobianas, y son reconocidos por inhibir un amplio rango de bacterias gram positivas y gram negativas. Las mieles oscuras se destacan por su actividad antibacteriana atribuida al peróxido de hidrógeno y al poder antioxidante de los ácidos fenólicos. Su contenido en antioxidantes es incrementado por poseer mayor cantidad de pigmentos vegetales, como carotenoides y, fundamentalmente, flavonoides (Manrique, 2011). ^(47,61)

2.2.2. Propóleo

2.2.2.1. Historia

El propóleo es tan viejo como la miel, y ha sido utilizado por el hombre durante siglos. Los antiguos egipcios representaban abejas en jarrones y otros ornamentos y usaban el propóleo para aliviar muchas dolencias así como para embalsamar a sus muertos. Los antiguos judíos consideraban el tzori (la palabra hebrea para propóleos) como una medicina. El Tzori y sus propiedades terapéuticas se mencionan en todo el Antiguo Testamento. El Bálsamo bíblico de Galaad es casi indistinguible del propóleos. Los griegos usaban el propóleo como el ingrediente principal del polyanthus, perfume que combina propóleo, olibanum, styrax y hierbas aromáticas. Hipócrates usó propóleo para curar heridas y úlceras, tanto externas como internas. Dioscórides describió el propóleo como un pegamento de abeja amarillo de aroma dulce y se asemeja a la resina del árbol Styrax. Plinio, en su famosa Historia Natural describe que el propóleo se produce a partir de la goma dulce de la vid o el álamo y que alivia los dolores de los nervios y las úlceras cicatriciales. En la Edad Media, el Propóleo se usaba contra las infecciones orales y faríngeas, así como para la caries dental. ^(3,15)

2.2.2.2. Etnobotánica

El Propóleo tiene fama de tener efectos antisépticos, antibacterianos, antimicóticos, astringentes, espasmolíticos, antiinflamatorios, anestésicos, antioxidantes, antitumorales, antimicóticos, antiulcerosos, anticancerosos e inmunomoduladores. Se ha utilizado en una variedad de aplicaciones, que incluyen ungüentos y cremas utilizados en la curación de heridas, el tratamiento de quemaduras, problemas de piel y úlceras. Se han aplicado varias preparaciones de propóleo en el tratamiento de problemas de laringe, enfermedades ginecológicas, asma y diabetes. El propóleo se ha usado en preparaciones de pasta de dientes y enjuagues bucales para tratar la gingivitis y la estomatitis. ^(4,7)

Las propiedades antivirales del propóleo se conocen desde hace muchos años. Se sabe desde hace mucho tiempo que el propóleo y sus extractos tienen un efecto positivo en la regeneración de los tejidos. Fue Scheller de Polonia quien popularizó el término EEP: extracto de etanol de propóleo. En la década de 1970 se realizó una serie de experimentos con el uso de EEP, en el que se encontraron 19 elementos. Scheller demostró que las soluciones EEP mantuvieron su actividad antibacteriana en pH ácido o neutro. Más tarde, investigadores polacos del equipo de Scheller demostraron que la aplicación de extracto etanólico de propóleo (EEP) promueve los procesos de curación en el cartílago dañado y mejora la osificación en los defectos óseos inducidos artificialmente. Se demostró que EEP apoya la regeneración de la pulpa dental y también reduce los procesos inflamatorios y degenerativos. ^(4,9)

Damyantiev y otros presentaron resultados positivos del tratamiento de heridas quirúrgicas supurativas con propóleo. Los extractos de propóleo se han utilizado ampliamente en odontología. El propóleo también demostró ser eficaz en el tratamiento del resfriado común y la amigdalitis crónica. ^(9,13)

El propóleo también se ha usado en productos cosméticos, como cremas faciales, ungüentos, lociones y soluciones. Las propiedades del propóleo se han discutido ampliamente en numerosos documentos de revisión. ^(13, 44)

2.2.2.3. Sinonimia

Con respecto al origen etimológico del vocablo Propóleo, el mismo que proviene de la zona de los Balcanes, son los griegos a quienes debemos el nombre de Propóleos. ⁽⁹⁾

Pro: A favor o en defensa de / Polis: ciudad.

Se le llama así debido a que es habitual que las abejas lo empleen para reducir el tamaño de la entrada de la colmena (piquera). En la Biblia (Tanaj) del pueblo Hebreo el Propóleos se conoce como Tzori. En latín se conoce como Propoliso (que significa: alisar o tapar). En América del norte llamado Propilo. En Europa Propóleos (siempre en plural como caries). En español, es denominado Propóleos, Propóleo, ambos términos son aceptados y ampliamente utilizado, aunque la tendencia es a preferir Propóleo, este es de mayor uso en América Latina, a menudo los científicos lo conocen como penicilina de la naturaleza, cola de abeja o antibiótico natural. ⁽⁹⁾

2.2.2.4. Origen

Existen dos teorías sobre la procedencia: Una teoría dice que el Propóleo es recolectado por las abejas de más de 15 días, los miembros de este grupo recolectan con sus mandíbulas varios productos biológicos (exudados) existentes en las plantas, toman partículas resinosas, gomosas complejas que son segregados sobre las yemas, corteza y ramas jóvenes de diferentes árboles, arbustos como el álamo, sauce, abedul, aliso, castaño silvestre, ciruelos, pino, enebro, etc. ⁽¹⁰⁾

También del peciolo de las hojas de algunas plantas herbáceas, después de sujetar las partículas resinosas la abeja mueve hacia atrás la cabeza hasta lograr desprender la resina y haciéndola pelotita la almacena con sus patas posteriores en los cestillos del polen esta actividad se realiza tantas veces sea necesario para llenar las cestillas, las enzimas de su boca (B-glicosilasa) participan también en la operación para evitar su adherencia, esta enzima hidroliza los glicósidos de flavonoides en aglicósidos de flavonoides, cuando llega a la colmena con la carga otras obreras la ayudan a descargar el propóleo, misión que llega a durar varias horas, si el material no es lo bastante maleable la abeja recolectora se instala en la piquera, donde espera a que el calor del sol ablande la carga y pueda desprenderse mejor de ella, las abejas realizan estas operaciones en los días calurosos con temperaturas superiores a 20°C, de 1:00am a 3:00pm aproximadamente. Los vuelos que realiza la abeja desde la colmena a la planta portadora de resina duran 15-20 minutos y la época de máxima recolección tiene lugar al final del verano. ^(45, 46)

Otra teoría sobre el origen de propóleo manifiesta que, las abejas recolectan las resinas, la cual es potenciada por las secreciones de sus glándulas salivales y por la digestión láctica de los gránulos de polen que se efectúa en un pequeño órgano que la abeja posee entre el buche y el intestino delgado, al llegar la abeja al panal, se reúne con otras obreras que los ayudan a descargar. Estas abejas obreras toman el material resinoso, el cual lo mezclan con cera de abeja y agregan secreciones salivales todo esto en conjunto da como resultado el propóleo de consistencia pegajosa. ^(45, 46)

2.2.2.5. Usos por la Colmena

Las abejas no almacenan el propóleo en celdas, sino que lo aplican, enseguida en alguna parte de la colmena. ⁽¹³⁾

Cuando recién acopiado es blando, en ese estado casi líquido es forzado por la abeja en hendiduras o grietas en el interior de la colmena a modo de un fino barniz, sobre la superficie de los panales se le encuentra por todas partes de la colmena. Se sabe que los panales vacíos, las abejas no atienden enseguida a la cría o almacenan la miel, primero revisten a la colmena de propóleo para preservarlas. Se ha determinado cinco aplicaciones que le dan al Propóleo: ^(13, 15)

- a) Cerrar las aperturas del exterior, fortalecer y unir las celdas, tapar rendijas, quebraduras o grietas del lugar que alberga a la abeja, barniza pisos y paredes de la colmena para protegerla mejor de la intemperie del invierno. ⁽¹⁴⁾
- b) En las zonas frías, para reducir el agujero por donde salen y entran las abejas de ahí que al observar una gran cantidad de propóleo es señal de que se acerca el invierno crudo y frío. ⁽¹⁴⁾
- c) Embalsamar (con propóleo y luego con cera, previniendo la descomposición) animales como ratones, escarabajos, lagartijas, etc. Que hayan ingresado a la colmena y que ellas dan muerte (les inyectan su veneno) con la finalidad de aislarlo, ante la dificultad que supondría sacarlo fuera de la colmena debido a su tamaño. ⁽¹⁴⁾
- d) Para fijar los panales verticales en la base de la entre tapa, el propóleo crea un ambiente desfavorable para prevenir el desarrollo de microorganismos (bacterias, hongos, virus). ⁽¹⁴⁾
- e) Para hacer paneles nuevos y celdas, con el objeto de desinfectar antes de la puesta de huevos por parte de la reina. ⁽¹⁴⁾

2.2.2.6. Recolección

La recolección está restringida a las abejas butinadoras (en última etapa de su existencia), la recolección empieza cuando la abeja utilizando sus antenas ubica una fuente de propóleo. ⁽⁴²⁾

Las abejas extraen resinas de las yemas de los árboles, estirándolos con su mandíbula y con ayuda del primer y segundo par de patas, la secreción de sus glándulas mandibulares (ácido 10-hidroxidecenoico) permite el ablandamiento para triturarlo y transportarlo. Ayudado con el tercer par de patas la resina recolectada es colocada en la cestilla, su abastecimiento puede ser en primavera, verano y en otoño, la mejor calidad y acumulación del propóleo es al final del verano e inicios del otoño, se necesita que la temperatura sea mayor de 20 °C, para que las sustancias estén menos duras. ⁽⁴²⁾

Al ingresar a la colmena, se dirigen inmediatamente al lugar donde este es requerido y permanecen quietas, permitiendo a las abejas propolizadoras, tomar algunas partículas de la sustancia, comprimirlas y agregarles cera para proceder al propolizado. ⁽⁴²⁾

2.2.2.7. Métodos de Cosecha

Disponemos de dos grandes grupos: ⁽⁴³⁾

a) Método Artesanal o Método de Raspado

Para un adecuado raspado, retirar las alzas y cuadros al preparar las colmenas para la invernada, ya que aprovechamos ese momento para confinar la colonia al menor espacio posible y el material excedente será transportado al taller del apicultor. Además en esa época la temperatura baja facilita la separación del propóleo de la madera y el estado rígido de la resina limita la posible contaminación con trozos de madera, abejas y otros contaminantes macroscópicos. Es recomendable utilizar una espátula de acero inoxidable, sin filo (no se recomienda el uso de cuchillos ya que pueden desprenderse mayor cantidad de astillas) para reducir el riesgo de arrasar virutas de maderas. ⁽⁴³⁾

Cuidar de no raspar donde haya pintura sobre la madera, pues esta es uno de los mayores responsables de la contaminación del propóleo y es fácilmente detectable. Se debe realizar el raspado del propóleo que se encuentra en las superficies interiores de la colmena, en ángulos, piezas metálicas, piquera, tapas, cuadros y cajas, desechando el que se encuentra en el fondo, pues generalmente está muy contaminado. ⁽⁴³⁾

La recolección se debe realizar con las manos y espátula libres de restos de miel, tierra o cualquier otra sustancia que pueda contaminarlo. Con esta técnica se corre el riesgo de llevarse astillas de madera, lo que tiene dos consecuencias nefastas, por un lado un propóleo muy impuro y por otro el daño del material. Durante la cosecha, no debe exponerse a la incidencia directa de los rayos solares, evitándose su almacenamiento cerca de fuentes de calor como el ahumado. No debe mezclarse con la cera que se encuentre en la tapa, entre los marcos y sobre ellos. ⁽⁴⁴⁾

Siempre debe tratar de evitarse que el propóleo se compacte para que no se alteren su valor porcentual de los principios activos. Para lograr que quede homogéneo, el propóleo recolectado no se debe comprimir con las manos, por el contrario, se debe mantener en formas de escamas y/o trozos sueltos. Terminando el proceso el producto tendrá una consistencia gomosa y elástica, además de un aroma agradable y aunque es blando y pegajosa a temperatura ambiente, una vez extraído y frío se vuelve duro y quebradizo, el propóleo no debe tener más de 2 años de envejecimiento. ⁽⁴⁴⁾

b) Método Técnico (Internos y Externos) o Método de Proceso

Dentro de los métodos técnicos se utilizan las mallas matrizadas.

Mallas de tejido mosquitero plástico (recordar que no sirven las mallas metálicas porque contaminan el propóleo y también las mallas de fibra de vidrio porque tienden a romperse en el primer intento de manipuleo). Las mallas de tejido mosquitero, es recomendable que sean blancas o de colores claros, evitando el color negro (hasta no demostrar que este color no sea contaminante) es útil colocar estas últimas en forma simétrica sobre el ancho del alza, se puede colocar una o dos rejillas plásticas, ambos elementos serán rápidamente propolizado, luego de algunas semanas se moverán hacia otro extremo. ⁽⁴⁴⁾

De tal modo que incentivamos a las obreras a que se enfrenten a los nuevos espacios vacíos, quienes no dejarán el más mínimo intersticio sin tapar. Lo cual las incentivará a mayor recolección cualquiera de estas mallas que se vaya a utilizar es conveniente instalarlas en primavera y otoño pudiendo ser retiradas en cualquier época del año, Cuando retiran las trampas, las enrollan, las ponen dentro de un recipiente hermético. ⁽⁴⁵⁾

Puede ser una bolsa de plástico transparente luego lo más rápido posible se lo lleva a un freezer a -10, -20°C, hasta que el propóleo este bien duro, más o menos por una hora. Para extraerlo, de las trampas, se sacan las mallas del freezer y se los colocan sobre una mesa en la que previamente se coloca un papel blanco limpio sobre el que se torsionan las trampas para que caiga el propóleo, observándose como una resina rígida, fácil de separar mediante el manipuleo. Así se llega a obtener el propóleo en bruto. ⁽⁴⁵⁾

Es conveniente, cuando se recolecta el propóleo de trampa, dejar un 20% en la trampa, esto permite hacer dos recolecciones en el verano. ⁽⁴⁵⁾

2.2.2.8. Composición química

La investigación sobre la composición química del propóleo comenzó a principios del siglo XX. Los primeros intentos para determinar la composición del propóleos se referían al fraccionamiento simple. Uno de los primeros informes es el de Dieterich y Helfenberg en el que presentan sus métodos de extracción y constituyentes del propóleo separados en alcohol, cloroformo y éter. En 1911, en su trabajo posterior, Dietrich identificó la vanillina en el propóleos, y otro investigador alemán que trabaja en el propóleos Küstenmacher identificó el ácido cinámico y el alcohol cinámico como componentes del propóleos. En 1926, Jaubert identificó el pigmento crisina, una flavona natural en el pegamento de abeja y también demostró que la crisina le da color a la cera de abejas. ^(3, 4, 39)

En 1927, un científico alemán Rösch confirmó la hipótesis de Plinio de que el propóleos se origina en los brotes de las plantas. Una serie de estudios realizados en Estados Unidos llevaron a la detección de pequeñas cantidades de vitaminas B1, B2, B6, C y E, así como de ácido nicotínico y ácido pantoténico en el propóleos. Los estudios sobre la composición química del propóleo continuaron en la década de 1960. Al principio, se pensaba que el propóleo era de química muy compleja, pero más bien constante, como la cera de abejas. Más tarde, sin embargo, el análisis de numerosas muestras de diferentes regiones geográficas, así como la aplicación de métodos de laboratorio avanzados, mostraron que la composición química del pegamento de abeja es muy variable. En 1969 Popravko, junto con otros, separó e identificó dos flavanonas e isovanilina, así como seis pigmentos flavonoides en el propóleos. Después de que Lavie demostró que el propóleo muestra actividad antibacteriana hacia *Bacillus subtilis*, *Bacillus alvei* y *Proteus vulgaris*, los científicos franceses lograron aislar de los extractos de propóleo la “flavon galangina”, que se encontró que era en parte responsable de esta actividad. ^(7, 9, 39)

Más tarde, el mismo equipo aisló e identificó pinocembrin, tectochrysin e isalpinin. En 1970, Cizmarik y Matel informaron la separación e identificación del ácido 3,4-dihidroxicinámico y el ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico que están presentes en el propóleo. Nikiforov con sus compañeros de trabajo detectó cobre y manganeso en el propóleo, y al mismo tiempo Herold examinó los residuos de cenizas del propóleo y encontró hierro, calcio, aluminio, vanadio, estroncio, manganeso y silicio en él. ^(7, 9, 39)

En la década de 1970, los avances en los métodos analíticos cromatográficos, como la cromatografía en columna y la cromatografía en capa fina, permitieron la separación y extracción de más componentes del propóleo. En 1975, Schneidweind y sus colaboradores identificaron 17 componentes del propóleo, incluidos 9 compuestos previamente identificados. Simultáneamente, Metzner con compañeros de trabajo que usan métodos bioautográficos demostró que solo unos pocos compuestos detectables en los extractos de propóleo tienen una actividad antimicótica significativa. En 1977, investigadores australianos separaron e identificaron cuatro flavonas, pinostrobina, sakuranetin, isosakuranetin, pterostilbene, chrysin, 3,5-dimetoxibencil alcohol y xanthorrhoeol. En 1979, Vanhaelen y Vanhaelen-Fastre utilizaron la cromatografía de gases (GC) y el (HPLC) en el análisis de propóleos. ^(7, 9, 39)

La aplicación de espectrometría de masas por cromatografía de gases (GC-MS) condujo a la identificación de azúcares en propóleos. Marcucci y Bankova *et al.* Han registrado más de 300 sustancias conocidas en el propóleo. Heinen y Linskens estudiaron los constituyentes de ácido graso del propóleo y mostraron que las fracciones de ácidos grasos contienen ácidos C7-C18. Popravko presentó 18 componentes químicos del propóleo, 14 de los cuales pertenecen a compuestos flavonoides. ^(13, 14, 39)

La composición del propóleo no es fija y varía considerablemente de una región a otra junto con la vegetación, de temporada en estación, y de colmena a colmena. En cada muestra de propóleo, típicamente se identifican más de 80 a 100 compuestos químicos. En total, al menos 180 compuestos diferentes se han identificado en el propóleo hasta el momento. Un amplio análisis reveló aproximadamente 50 componentes en el propóleo europeo "típico", que proviene generalmente de árboles, como álamos y coníferas. Estos constituyentes comprenden principalmente resinas y bálsamos vegetales, principalmente ácido cinámico y derivados, ácido cumárico, compuestos prenilados, artemillin C (50%), cera de abejas (30%), aceites esenciales (10%), polen de abeja (5%) y minerales, polisacáridos, proteínas, aminoácidos, aminos, amidas y restos orgánicos (5%). Los principales constituyentes del propóleo de la mayoría de las fuentes son los flavonoides. ^(13, 39, 42)

Se ha encontrado que algunos de los principales ésteres fenólicos y flavonoides como el fenetil éster de ácido cafeico, quercetina, baicalina, pinocebrina, naringina, galangina y crisina son responsables de las actividades antimicrobianas, antioxidantes y antiinflamatorias del propóleo. En regiones tropicales, las abejas también recolectan resina de las flores en los géneros *Clusia* y *Dalechampia*, además de una gran variedad de árboles. Estos son los únicos géneros de plantas conocidas que producen resinas florales para atraer a los polinizadores. ⁽⁴²⁾

Como señaló Ghisalberti en su reseña del propóleo, muchos compuestos aislados hasta ahora del propóleo representan una fracción de su contenido. La mayoría de ellos provienen de la parte del propóleo soluble en solventes orgánicos, mientras que la mayor parte del pegamento de abejas que no es fácilmente soluble en agua o solventes orgánicos muy probablemente consiste de material polimérico natural. ⁽⁴²⁾

El propóleo presenta una amplia composición química. Ya en el año 1987 Penelope Walker y Eva Crane, publicaban la existencia de 149 compuestos y de 22 minerales identificados y reportados en la literatura. Hoy más de 300 componentes han sido identificados o caracterizados en las muestras de propóleo, incluyendo: flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos grasos, fenoles, aminoácidos, vitaminas y minerales (Pereira et al., 2002). En general, es posible observar que los principales polifenoles son los flavonoides, acompañado por ácidos fenólicos y ésteres, aldehídos fenólicos, cetonas, entre otros. ⁽⁴²⁾

El propóleo contiene aceites volátiles, ácidos aromáticos, las ceras, resinas, bálsamos y granos de polen que son una rica fuente de elementos esenciales como: magnesio, níquel, calcio, hierro y zinc (Castaldo y Capasso, 2002). Los flavonoides junto con los ácidos fenólicos y sus ésteres, genéricamente denominados “compuestos fenólicos”, son actualmente considerados los principales componentes bioactivos del propóleo. Ambos, absorben radiación en la región UV del espectro electromagnético protegiendo de la radiación solar a los tejidos vegetales más sensibles, esta propiedad es de especial interés ya que minimizan la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres, contribuyendo de esta manera a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Bedascarrasbure et al.,2004). ⁽⁴⁵⁾

Estos “compuestos fenólicos”, son el blanco de las 7 investigaciones actuales por presentar una gran cantidad y diversidad de propiedades farmacológicas y también, porque cuanto más se avanza en el descubrimiento de antibióticos poderosos, mayor es la necesidad de conocer las propiedades terapéuticas del propóleo, que a través de sus extractos parciales o totales se ha mostrado efectivo contra cepas de gérmenes patógenos que ya adquirieron resistencia a los antibióticos tradicionales y que curiosamente con el tiempo no han mostrado resistencia al propóleo (Asís, 1996 citado por Neacato S., 2005). ⁽⁴⁵⁾

Mediante modernos métodos analíticos se está develando su compleja composición, estableciéndose que son más de 100 los componentes que actúan en sinergismo (Bedascarrasbure et al., 2006b). La composición química de los propóleos depende de la ubicación geográfica de recolección, el tipo de vegetación y el disolvente utilizado para la extracción. Generalmente, la composición química más usual muestra compuestos polifenólicos, flavonoides, ácidos fenólicos, ésteres, terpenos, minerales como: Mg, Ca, I, K, Na, Cu, Zn, Mn y Fe y algunas vitaminas entre las cuales están: vitamina B1, B2, B6, C, vitamina E. Así como de ácidos grasos (Ramírez, & et al., 2014).⁽⁴⁶⁾

En la actualidad, han sido identificados más de 300 compuestos químicos como constituyentes de los propóleos de diferentes zonas geográficas del mundo. Entre los más estudiados destacan los flavonoides, que se clasifican según su estructura química y han sido aislados desde propóleos de China, Polonia, México, Kenia, Nepal, Canadá, Cuba, Grecia y Japón. Otros componentes como: lignanos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, fenilpropanoides prenilados, ésteres, estilbenos y cumarinas se han identificado en diversas muestras de distintas zonas geográficas.⁽⁴⁶⁾

Su variada composición química, depende de la temporada climática, del lugar donde la abeja recolecta las resinas o exudados de los árboles y la flora local predominante, condiciona los diferentes tipos de propóleos de acuerdo a su ubicación geográfica (Huang, 2014; Bankova, & et al., 2016; Salas, & et al., 2016; El Nakadi, & et al, 2017).⁽³⁹⁾

2.2.2.9. Actividad Antibacteriana

Fritz J. (2011), presentaron el estudio titulado “Caracterización Química del Propóleo Chileno”. El objetivo fue evaluar los compuestos químicos presentes en el propóleo chileno de diferentes regiones del país.⁽⁶²⁾

En su investigación, describe acerca de las propiedades antibacterianas del propóleo. Actualmente se ha mostrado que el extracto del propóleo tiene efectos bacteriostáticos sobre al menos 30 cepas microbianas. En esta era, múltiples estudios bacteriológicos in vivo e in vitro confirmaron su acción bacteriostática y bactericida, se señala como principal responsable de esta propiedad a los flavonoides y derivados de los ácidos benzoicos, ferúlico y cafeico. El ácido cinámico y algunos flavonoides desactivan la energía de la membrana citoplasmática, inhibiendo la motilidad bacteriana, haciéndola más vulnerable al ataque del sistema inmunológico y potenciando a los antibióticos. Anteriormente se descubrió que el propóleo es capaz de desorganizar el citoplasma, la membrana citoplasmática y la pared celular causando bacteriólisis parcial inhibiendo la síntesis proteica. El mayor efecto antibacteriano del propóleo se observa frente a gérmenes Gram positivo, incluso cepas Meticilino resistentes también muestran susceptibilidad al Estreptococo beta hemolítico, y numerosas bacterias Gram negativo dentro de las que se describen algunas *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia Coli* y *Proteus*.⁽⁶²⁾

Sánchez K. (2017), presentaron el estudio titulado “Composición Química y Potencial Biológico de una muestra de Propóleos Ecuatoriano”. El objetivo fue evaluar la relación entre la composición química de una muestra de propóleos y su potencial biológico, mediante el empleo de métodos cromatográficos, espectroscópicos y modelos biológicos experimentales. En su investigación, describe acerca de la acción antibacteriana que posee el propóleos se les atribuye a sus constituyentes, principalmente a flavonoides, ácidos grasos, ésteres, hidroxiacidos, sesquiterpenos y demás componentes, que juntos establecen un sinergismo significativo para ejercer la actividad biológica. La literatura menciona diferentes ensayos satisfactorios realizados con propóleos frente a cepas bacterianas de importancia clínica, entre estas están:^(38, 69)

Bacillus cereus, *Staphylococcus aureus*, *S. Enterococcus* sp, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Helicobacter pylori* (Melliou, & et al., 2007; Raghukumar, & et al., 2010; Sanpa, & et al., 2015; Villanueva, & et al., 2015).^(38, 69)

El método se fundamenta en ensayar el extracto frente a cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos. Consiste en depositar discos de papel filtro impregnados con el extracto a ensayar con una concentración conocida en la superficie de una placa con agar Mueller Hinton previamente inoculada con el microorganismo, este va absorber agua y el extracto difunde por el agar, formando un gradiente de concentración.^(38, 69)

Luego de 18 a 24 horas de incubación a 37°C, los discos presentan una zona de inhibición del crecimiento bacteriano (Taroco, & et al., 2010). Este método es el más utilizado por los laboratorios clínicos por ser fácil de estandarizar y ofrecer resultados cualitativos reproducibles.

Se basa en el método de Kirby-Bauer el cual fue estandarizado y recomendado por el Comité de Ensayos de Susceptibilidad (NCCLS) de los Estados Unidos y en estudios realizados para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal (Ramirez, & et al., 2009; Taroco, & et al., 2010).^(38, 69)

2.3. Bases Microbiológicas

2.3.1. Requerimiento para el Desarrollo Bacteriano

Los requerimientos nutricionales de cada grupo microbiano están dados por la composición química de las células que los constituyen y por sus características genéticas las que determinan sus propiedades fisiológicas y su capacidad para utilizar y transformar los compuestos que se encuentran en el ambiente en que se desarrollan.⁽¹⁸⁾

En general los requerimientos nutricionales de los microorganismos reflejan el ambiente natural en que viven; este conocimiento y el uso de medios de cultivo de composición química definida, son de primordial importancia en el estudio de la nutrición microbiana cuyas características varían ampliamente entre los microorganismos. Algunos tienen requerimientos nutricionales muy simples, obtienen su energía de compuestos inorgánicos y utilizan CO₂ o carbonatos como fuente de carbono, en tanto que otros requieren de compuestos orgánicos con diferentes grados de complejidad. La fuente de nitrógeno, la obtienen a partir de aminoácidos o nitrógeno inorgánico en diferentes estados de oxidación incluyendo el nitrógeno molecular. Respecto a los requerimientos de oxígeno, los microorganismos pueden vivir con diferentes concentraciones de este elemento. ⁽¹⁹⁾

Algunos nutrientes constituyen las unidades fundamentales para que la célula elabore macromoléculas estructurales y funcionales, mientras que otros sirven como donadores de electrones y algunos más como aceptores sin ser incorporados directamente al material celular. A veces un mismo nutriente puede desempeñar todas las funciones, lo que dependerá del tipo de microorganismo y de las condiciones ambientales. Los microorganismos adquieren el carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y oxígeno, así como su energía, de forma muy variable, lo que determina que los microorganismos presenten múltiples tipos nutricionales. Una clasificación sencilla es aquella que se basa en dos variables: la naturaleza de las fuentes de energía y de carbono. Con relación a la fuente de energía se clasifican: ⁽²⁰⁾

- Fotótrofos, estos utilizan la energía electromagnética (luz) para su desarrollo.
- Quimiótrofos, que obtienen su energía a partir de la oxidación de compuestos químicos, y que a su vez se subdividen en: o Quimiolitótrofos (oxidación de compuestos inorgánicos) o Quimiorganótrofos (oxidación de compuestos orgánicos).

Con respecto a la fuente de carbono, se clasifican como: ⁽²⁰⁾

- Autótrofos, microorganismos que usan CO₂ y carbonatos.
- Heterótrofos, aquellos que utilizan compuestos orgánicos.

De acuerdo con estos criterios, los microorganismos se ubican en cuatro clases nutricionales las que se describen en el Tabla N° 08. No obstante, la versatilidad fisiológica de los microorganismos determina que la clasificación expuesta no sea de ninguna manera estricta, como lo demuestran los siguientes ejemplos: algunos microorganismos fotoautótrofos crecen también en la oscuridad comportándose como quimioheterótrofos. Esta versatilidad se conoce como facultativo. Asimismo, algunas bacterias y algas fotoautotróficas son incapaces de sintetizar alguno de sus constituyentes celulares a partir de CO₂, por lo que generalmente viven asociadas con otros microorganismos que le proporcionan este componente y cuando se les cultiva en medios artificiales es necesario suministrar ese compuesto orgánico. Es importante recalcar que aun cuando el grupo bacteriano es, desde el punto de vista estructural, el más simple de los microorganismos (procariotas); fisiológicamente es el más complejo y el único en el que se encuentran todos los tipos nutricionales descritos. ⁽²⁰⁾

Tabla N° 08. Clasificación Nutricional de los Microorganismos. ⁽²⁰⁾

Clases nutricionales	Fuente de energía	Fuente de carbono	Ejemplos de grupos microbianos
Fotoautótrofas	Luz	CO ₂ , Carbonatos	Algas y algunas bacterias
Fotoheterótrofas	Luz	Compuestos orgánicos	Bacterias verdes y rojas
*Quimioautótrofas	Oxidación de compuestos inorgánicos como NH ₃ , NO ₂ ⁻ , H ₂ , H ₂ S, S ⁰ , S ₂ O ₃ , Fe ⁺⁺	CO ₂	Bacterias oxidantes del nitrógeno, hidrógeno, azufre y hierro
**Quimioheterótrofas	Oxidación de compuestos orgánicos	Sustratos orgánicos	Protozoarios, hongos y la mayoría de las bacterias

*Debido a la capacidad distintiva de crecer en medios estrictamente minerales, también se les denomina Quimiolitótrofos (de la palabra griega lithos, roca).

**Estos microorganismos utilizan al mismo nutriente como fuente de carbono y de energía.

A los compuestos orgánicos que actúan como precursores o como constituyentes de material celular y que no pueden ser sintetizados a partir de compuestos de carbono más sencillos se les llama colectivamente factores de crecimiento; éstos, por su estructura química y acción metabólica, se dividen en tres clases: ⁽²¹⁾

- Aminoácidos, requeridos como constituyentes de proteínas.
- Purinas y pirimidinas, constituyentes de los ácidos nucleicos.
- Vitaminas, representadas por compuestos orgánicos que forman parte de grupos prostéticos o centros activos de numerosas enzimas.

Con base en las necesidades de factores de crecimiento, se emplean otros dos términos: ⁽²¹⁾

- Protótrofos, microorganismos capaces de cubrir todas sus necesidades a partir de la fuente principal de carbono, por lo tanto no requieren factores de crecimiento.
- Auxótrofos, son aquellos que requieren, de uno o más nutrientes orgánicos además de la principal fuente de carbono.

El nitrógeno y el azufre se encuentran en los compuestos orgánicos de la célula, principalmente en forma reducida como grupos amino y sulfhidrilo. Los microorganismos toman dichos elementos en diferentes estados de oxidorreducción y pueden tener las siguientes funciones: Fuente de nitrógeno y azufre, en cuyo caso son asimilados e incorporados al material celular. ⁽²¹⁾

- La mayoría de los microorganismos fotosintéticos, muchas bacterias no fotosintéticas y los hongos, asimilan estos dos elementos en estado inorgánico como nitratos (NO_3^-) y sulfatos ($\text{SO}_4^{=}$), y su utilización implica una reducción preliminar; de nitratos a amoníaco y de sulfatos a sulfuro para su incorporación al material celular, este proceso se conoce como reducción asimiladora de nitratos o de sulfatos. ⁽²²⁾

- Otros microorganismos son incapaces de efectuar esta reducción, por lo que estos elementos deben ser proporcionados como sales de amonio, o como sulfuros, o como compuestos orgánicos que los contengan como la cisteína. En este caso, el aminoácido puede ser además fuente de carbono y de energía. ⁽²²⁾
- Existen algunas bacterias que son capaces de utilizar el N₂ atmosférico, para ello lo reducen a amoníaco a través de un proceso también de asimilación denominado fijación de nitrógeno. ⁽²²⁾

Donadores de electrones, en las bacterias quimiolitótrofas, la energía se obtiene por oxidación de amoníaco a nitritos y éstos a nitratos, como ocurre con las nitrificantes; o bien por la oxidación de sulfuros, azufre o tiosulfatos a sulfatos como lo hace *Thiobacillus thiooxidans*. Aceptores de electrones, en este caso los nitratos se reducen a nitritos, óxidos de nitrógeno y nitrógeno elemental a través de un proceso de desasimilación conocido como desnitrificación. Del mismo modo los sulfatos pueden ser reducidos a sulfuros. Ambos procesos se llevan a cabo en condiciones de anaerobiosis. El fósforo es asimilado como fosfatos de origen inorgánico u orgánico y forma parte de las membranas celulares, del material genético y del ATP. ⁽²²⁾

Concentraciones elevadas de fosfatos inorgánicos determinan la inhibición en el crecimiento de muchos microorganismos, aunque algunos son tolerantes. El oxígeno, como constituyente universal de las células, es un nutrimento proporcionado en cantidades abundantes por el agua; sin embargo, la mayoría de los microorganismos requieren además oxígeno molecular. Respecto a la necesidad o tolerancia de esta molécula, se tiene que los microorganismos se clasifican en cinco grupos: ⁽²²⁾

- Aerobios estrictos, aquéllos que crecen de manera obligada en condiciones óxicas o aerobias con presencia de tensiones normales de oxígeno, el que utilizan como aceptor final de electrones para cubrir sus necesidades energéticas. ⁽²²⁾

- Microaerofílicos, los que crecen en tensiones de O₂ menores a las del aire o condiciones microtóxicas. ⁽²²⁾
- Facultativos, emplean alternativamente oxígeno molecular u otros compuestos inorgánicos u orgánicos como aceptores finales de electrones por lo que crecen de acuerdo a las condiciones que prevalecen en su hábitat, aerobias o anaerobias. ⁽²⁴⁾
- Anaerobios estrictos, aquéllos que no requieren de este elemento para su desarrollo, y la presencia de O₂ inhibe su desarrollo o incluso provoca su muerte. Tal es el caso de las bacterias reductoras de sulfatos y de las bacterias metanogénicas que utilizan el CO₂ como aceptor de electrones y lo reducen a metano. ⁽²⁴⁾
- Aerotolerantes, son organismos anaerobios, pero que a diferencia de los estrictos, estos toleran el O₂ y crecen en su presencia aunque no puedan utilizarlo. ⁽²⁴⁾

2.3.2. Factores Accesorios de Crecimiento

Requisitos Físicos

Temperatura

El patrón de crecimiento bacterial se ve profundamente influenciado por la temperatura. La temperatura a crecimiento óptimo permite el crecimiento más rápido de las bacterias durante un período de tiempo, usualmente entre 12 y 14 horas. La temperatura mínima de crecimiento es aquella temperatura menor a la cual la especie puede crecer. La Temperatura de crecimiento máximo es la temperatura mayor en la cual el crecimiento es posible. Los microorganismos se dividen en 3 grandes grupos en base a su preferencia de rango de temperatura. ⁽²⁴⁾

Psicrófilos son capaces de crecer a 0°C o menos, pero crecen mejor a una temperatura mayor. ⁽²⁵⁾

Estas bacterias son capaces de crecer a 0°C, pero tienen una temperatura óptima de 15°C o menos y una máxima de aproximadamente 20°C. Los psicrófilos estrictos mueren si se exponen a la temperatura de salón. Ejemplo las bacterias que crecen en la Antártica. Aún a una temperatura óptima estas bacterias se tardan en crecer de 2 a 3 semanas. Los psicrófilos facultativos o psicrotrofos son aquellos organismos que pueden crecer a 0°C, pero crecen mejor a una temperatura de entre 20 a 30°C. Los mesófilos crecen mejor a temperaturas que fluctúan de entre 25°C a 40°C. Aquí encontramos los patógenos de humanos, éstos crecen mejor a 37°C. Los termófilos son bacterias que crecen a una temperatura óptima sobre los 45°C. La región de crecimiento de muchos termófilos se extiende a la región de los mesófilos. Estas se conocen como termófilos facultativos. La temperatura óptima de crecimiento para estos últimos microorganismos es entre 50 a 60°C. Los termófilos extremos crecen a una temperatura mayor de 90°C. Es muy importante señalar que una bacteria no manifiesta las mismas características de cultivo cuando se crece a diferentes temperaturas. ^(24, 25)

PH

En la mayoría de las bacterias el crecimiento óptimo es entre 6.5 y 7.5. Muy pocas bacterias crecen a un pH menor de 4.0. Sin embargo, las bacterias clasificadas como acidófilos son tolerantes a la acidez, un ejemplo es *Thiobacillus thiodans* que crece a un pH óptimo de entre 2.0 a 3.5. ⁽⁵²⁾

Presión osmótica

Los microorganismos requieren agua para su crecimiento, además para obtener nutrientes de ésta. Una presión osmótica alta causa pérdida de agua y plasmólisis de la célula, por lo que se utiliza este fenómeno para conservar los alimentos ya sea añadiendo sal o azúcar, lo que previene el crecimiento bacteriano. ⁽⁵³⁾

Sin embargo algunas bacterias se han adaptado a altas concentraciones de sal, a éstas se les conoce como halófilos extremos. Por otro lado, los halófilos facultativos no requieren una alta concentración de sal, pero pueden crecer hasta una concentración de 2%. Otras bacterias pueden tolerar hasta un 15% de sal. ⁽⁵³⁾

Requisitos Químicos

Carbono (C): todos los organismos requieren C para sintetizar los componentes celulares. Nitrógeno, azufre y fósforo: estos elementos se requieren para la síntesis de DNA, RNA, proteínas y ATP. Las bacterias pueden obtener nitrógeno (N) ya sea fijándolo directamente de la atmósfera, como por ejemplo el género bacteriano *Rhizobium*. También pueden obtener este elemento de compuestos inorgánicos que contengan N como nitritos, nitratos, sales de amonía o amino ácidos. Las bacterias pueden obtener azufre de iones de sulfato, sulfito de hidrógeno y amino ácidos con azufre. El fósforo es esencial para la síntesis de ácidos nucleicos y membranas celulares. Una fuente para obtener fósforo son los iones de fosfato y el ATP. ⁽⁵⁴⁾

Elementos trazas. Otros elementos como hierro, cobre, molibdeno y zinc son requeridos por los microorganismos en pequeñas cantidades. Usualmente tienen función de cofactores. Oxígeno: no todos los microorganismos necesitan O₂, sin embargo, muchas formas de vida requieren oxígeno para llevar a cabo respiración aeróbica. Los microorganismos que utilizan oxígeno molecular son llamados aeróbicos. ⁽⁵⁴⁾

Estos se clasifican en aeróbios obligados que son los que requieren oxígeno molecular para vivir, y los aeróbios facultativos los cuales utilizan el oxígeno molecular cuando está presente, pero en su ausencia continúan su crecimiento por la vía de fermentación o respiración anaeróbica, un ejemplo es *Escherichia coli*. ⁽⁵⁴⁾

Por otro lado tenemos los anaeróbios obligados que necesitan ausencia de oxígeno molecular para crecer y donde este generalmente es tóxico, un ejemplo es el género *Clostridium*. Estos microorganismos obtienen el átomo de oxígeno molecular del agua. También se observan microorganismos anaeróbios Aerotolerantes los cuales no utilizan el oxígeno molecular para su crecimiento, pero pueden tolerarlo. Los microaerofílicos sólo pueden crecer en concentraciones de oxígeno molecular menor a las encontradas en el aire. Factores orgánicos de crecimiento: estos son compuestos orgánicos esenciales que el organismo no puede sintetizar, aquí se incluyen las vitaminas, los aminoácidos, las purinas y las pirimidinas. ⁽⁵⁷⁾

2.3.3. Medios de Cultivo

Un medio de cultivo es una técnica de laboratorio que consta de un gel o una solución que contiene los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, microorganismos, células, tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas. Según lo que se quiera hacer crecer, el medio requerirá unas u otras condiciones. Generalmente se presentan desecados en forma de polvo fino o granular antes de ser preparados; ya preparados pueden encontrarse en estado sólido, semisólido o líquido. ⁽⁵⁶⁾

El objetivo último del cultivo es variado: antibiograma, identificación, multiplicación. Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones físico químicas. ⁽⁵⁶⁾

2.3.3.1. Clasificación

Los medios de cultivo bacteriano pueden clasificarse en al menos tres formas; Basado en la consistencia, basado en el componente nutricional y en función de su uso funcional. ^(56, 65, 67)

a) Clasificación basada en la coherencia

Medios líquidos

En medio líquido, las bacterias crecen produciendo turbidez, una película superficial (como el *Vibrio* y *Bacillus*) o formando depósitos granulares (como los estreptococos). Cultivar bacterias en medios líquidos tiene algunos inconvenientes, debido a que las propiedades de las bacterias no son visibles en los medios líquidos y no se puede detectar la presencia de más de un tipo de bacteria. ^(59, 65, 67)

Medios sólidos

Cualquier medio líquido puede volverse sólido mediante la adición de ciertos agentes solidificantes. El agar agar es el agente solidificante más comúnmente utilizado. Es un polisacárido no ramificado obtenido de las membranas celulares de algunas especies de algas rojas, como el género *Gelidium*. El agar se compone de dos polisacáridos de cadena larga (70% de agarosa y 30% de agar pectina). Se funde a 95 °C y se solidifica a 42 °C, no aporta ninguna propiedad nutritiva, no es hidrolizado por la mayoría de las bacterias y, por lo general, está libre de sustancias estimulantes del crecimiento o retardantes del crecimiento. El agar está disponible como polvos. El agar neozelandés y el agar japonés se usan con mayor frecuencia a una concentración del 2% y 4% respectivamente para formar un agar medio sólido. ^(59,67)

Medios semisólidos

La reducción de la cantidad de agar entre 0.2–0.5% rinde un medio semisólido. Dichos medios son bastante suaves y son útiles para demostrar la motilidad bacteriana (se usa el tubo en U y tubo de Cragie). Ciertos medios de transporte como los medios Stuart y Amies son de consistencia semisólida. ^(59, 67)

El medio de prueba de fermentación por oxidación de Hugh & Leifson, así como el medio de motilidad del manitol también son semisólidos. ⁽⁵⁹⁾

Medios bifásicos

A veces, un sistema de cultivo comprende tanto un medio líquido y sólido en el mismo recipiente. Esto se conoce como medio bifásico (sistema de Castañeda para hemocultivo). El inóculo se agrega al medio líquido y, cuando se van a realizar subcultivos, la botella o recipiente, simplemente se inclina para permitir que el líquido fluya sobre el medio sólido. Esto obvia la necesidad de abrir frecuentemente la botella de cultivo para subcultivar. ^(59, 68)

Otros agentes solidificantes

Además de agar, la yema de huevo y el suero; también pueden usarse para solidificar los medios de cultivo. El medio que contiene suero como la pendiente del suero de Loeffler y los medios que contienen huevos tales como el medio Lowenstein Jensen y el medio de huevo Dorset, se solidifican y se desinfectan mediante un proceso de infusión. ⁽⁵⁹⁾

b) Clasificación basada en el componente nutricional

Los medios se pueden clasificar como simples, complejos y sintéticos. Se dice que las bacterias que pueden crecer con requisitos mínimos no son exigentes y las que requieren nutrientes adicionales son exigentes. Los medios simples como el agua de peptona y el agar nutriente pueden soportar la mayoría de las bacterias no exigentes. ^(54, 68)

Los medios complejos como el agar sangre tienen ingredientes cuyos componentes exactos son difíciles de estimar. Los medios sintéticos o definidos como el medio Davis & Mingioli son medios preparados especialmente para fines de investigación donde la composición de cada componente es bien conocida. ^(51, 68)

c) Clasificación basada en el uso o aplicación funcional

Los medios basales son básicamente medios simples que admiten la mayoría de las bacterias no exigentes. El agua peptonada, el caldo nutriente y el agar nutritivo, son considerados medios basales. Los medios enriquecidos se utilizan para cultivar bacterias nutricias exigentes. La adición de nutrientes adicionales en forma de sangre, suero, yema de huevo, etc., al medio basal los convierte en medios enriquecidos. El agar sangre, el agar chocolate, el suero de Loeffler, etc., son algunos de los medios enriquecidos. ^(65, 67)

El agar de sangre se prepara añadiendo 5-10% (en volumen) a un medio basal tal como agar nutriente u otras bases de agar sangre. Como la sangre no se puede esterilizar, debe recogerse asépticamente del animal. Los animales deben sangrarse y la sangre se recoge en recipientes estériles con anticoagulante o perlas de vidrio. Si bien se prefiere la sangre de oveja, también se puede recolectar sangre de conejo, caballo y buey. Debe evitarse la sangre humana, ya que puede contener sustancias inhibitoras, incluidos antibióticos. Después de que la base de agar sangre se esteriliza en autoclave, se agrega sangre al medio a una temperatura justo por encima del punto de solidificación del agar. La mezcla se vierte sobre las placas y se deja solidificar. El agar sangre es útil para demostrar la hemólisis ^(21, 67).

El agar chocolate también se conoce como agar sangre calentada o agar con sangre lisa. El procedimiento es similar al de la preparación con agar sangre, excepto que se agrega sangre mientras que la base de agar con sangre fundida aún está caliente. Esto lisa las células sanguíneas y libera sus contenidos en el medio. Este proceso convierte el marrón medio, de ahí el nombre. Este medio es especialmente útil en el cultivo de *Hemophilus* sp y *Neisseria* sp. El suero para el medio se puede obtener de la sangre de los animales, pero se debe filtrar a través de una membrana o un filtro Seitz antes de su uso. ^(21, 67)

Los medios selectivos y de enriquecimiento están diseñados para inhibir las bacterias comensales o contaminantes no deseadas y ayudar a recuperar el patógeno de una mezcla de bacterias. Mientras que los medios selectivos se basan en agar, los medios de enriquecimiento son líquidos en consistencia. Varios enfoques para hacer un medio selectivo incluyen la adición de antibióticos, colorantes, productos químicos, alteración del pH o una combinación de estos. ⁽⁶⁷⁾

El agar Thayer Martin, es utilizado para reconocer *Neisseria gonorrhoeae*; contiene vancomicina, colistina y nistatina. El agar de manitol salado y el agar de leche de sal, son utilizados para reconocer *S. aureus*; contienen 10% de NaCl. El medio de telurito de potasio, es utilizado para reconocer *C. diphtheriae*; contiene 0,04% de telurito de potasio. El agar de Mac Conkey, es utilizado para reconocer miembros de la familia Enterobacteriaceae: contiene sal biliar que inhibe la mayoría de las bacterias gram positivas. ⁽⁶⁷⁾

El agar ceftrimida, es utilizado para reconocer *Pseudomonas aeruginosa*; contiene ceftrimida. El Agar cristalino de sangre violeta, es utilizado para reconocer *S. pyogenes*; contiene 0,0002% de violeta cristal. El medio Lowenstein Jensen, es utilizado para reconocer *M. tuberculosis*; se hace selectivo mediante la incorporación de malaquita verde. El agar de Wilson & Blair, es usado para reconocer *S. typhi*; se vuelve selectivo mediante la adición de colorante verde brillante. ^(59, 65)

El agar TCBS y el agar Monsur's Tellurite Taurocholate Gelatina, es utilizado para aislar *V. cholerae* de muestras fecales; tienen pH elevado (8.5-5.6), que inhibe la mayoría de las otras bacterias. ^(59, 65)

- Los medios de enriquecimiento son medios líquidos que también sirven para inhibir los comensales en la muestra clínica. El caldo de selenita F, el caldo de tetrionato y el agua de peptona alcalina se utilizan para recuperar patógenos de muestras fecales. ^(59, 68)

Medios diferenciales / indicadores

Los medios diferenciales distinguen un tipo de microorganismo de otro que crece en el mismo medio. Este tipo de medio utiliza las características bioquímicas de un microorganismo que crece en presencia de nutrientes con indicadores (como rojo neutro) agregados al medio para indicar de forma visible las características definitorias de un microorganismo. Cuando se incorpora un sustrato particular en un medio y una mezcla de bacterias inoculadas en él, solo la bacteria que puede fermentar produce ácido. Este cambio en el pH se detecta mediante el uso de un indicador de pH incorporado y la bacteria que puede fermentar el azúcar aparece en un color diferente. Este enfoque se usa en el agar Mac Conkey, agar CLED, etc. ^(23, 65)

El agar de Mac Conkey es el medio más utilizado para cultivar e identificar bacilos gramnegativos. Contiene sales biliares (agente selectivo), lactosa (azúcar), peptona y rojo neutro (indicador de pH), agar y agua. Aquellas bacterias que pueden fermentar la lactosa producen colonias rosadas donde las colonias que no fermentan lactosa producen colonias incoloras. De manera similar, el *Vibrio cholerae* produce colonias de color amarillo sobre sacarosa que contiene medio TCBS. ^(23, 65)

La reducción de telurito de potasio a telurio metálico por *Corynebacterium diphtheriae* da como resultado la producción de colonias de color negro en agar KT. La producción de H₂S por *Salmonella typhi* da como resultado la producción de colonias de color negro en el medio de Wilson y Blair. ^(23, 65)

Medios de transporte

Las muestras deben ser transportadas al laboratorio inmediatamente después de la recolección para prevenir el crecimiento excesivo de microorganismos contaminantes. ^(67, 68)

Esto se puede lograr utilizando medios de transporte. Dichos medios previenen el secado (deseccación) de la muestra, mantienen la viabilidad de todos los organismos en la muestra sin alterar su concentración. Algunos de estos medios (de Stuart y Amie) son de consistencia semisólida. La adición de carbón sirve para neutralizar factores inhibidores. El medio de Cary Blair y el medio de Venkatraman Ramakrishnan, se utilizan para transportar las heces de pacientes sospechosos de cólera. La solución salina de glicerol tamponada de Sach se usa para transportar las heces de pacientes con sospecha de disentería bacilar. ^(67, 68)

Medios anaeróbicos

Las bacterias anaeróbicas necesitan una oxidación reducida, un potencial de reducción y nutrientes adicionales. Dichos medios pueden reducirse por medios físicos o químicos. Hervir el medio sirve para expulsar cualquier oxígeno disuelto. La adición de glucosa al 1%, tioglicolato al 0,1%, ácido ascórbico al 0,1%, cisteína al 0,05% o limaduras de hierro al rojo vivo puede reducir el medio. Robertson cocinó carne que se usa comúnmente para cultivar *Clostridium* spp medio. El caldo de tioglicolato contiene tioglicolato sódico, glucosa, cistina, extracto de levadura e hidrolizado de caseína. El azul de metileno o resazurina es un indicador de potencial de oxidación-reducción que se incorpora en el medio. En condiciones reducidas, el azul de metileno es incoloro. ^(24, 68)

2.3.3.2. Preparación

Se debe tener cuidado para ajustar el pH del medio antes del tratamiento en autoclave. Varios indicadores de pH que están en uso incluyen rojo fenol, rojo neutro, azul de bromotimol, púrpura de bromocresol, etc. ^(35, 65)

Los medios deshidratados están disponibles comercialmente y deben reconstituirse según las recomendaciones de los fabricantes. La mayoría de los medios de cultivo se esterilizan en autoclave. Ciertos medios que contienen componentes lábiles al calor como la glucosa, los antibióticos, la urea, el suero y la sangre no se esterilizan en autoclave. Estos componentes se filtran y se pueden agregar por separado después de que el medio se esteriliza en autoclave. Ciertos medios altamente selectivos como el medio Wilson y Blair y el agar TCBS no necesitan ser esterilizados. Es imperativo que una representación de cada lote se evalúe en cuanto a rendimiento y contaminación antes de su uso. Una vez preparados, los medios se pueden mantener a 4-5 ° C en el refrigerador durante 1-2 semanas. Ciertos medios líquidos en botellas con tapón de rosca se pueden mantener a temperatura ambiente durante semanas. ^(35, 67)

2.3.3.3. Esterilización

La mayoría de los medios de cultivo, especialmente los medios que deben usarse en entornos controlados (como placas de agar) y los medios que se utilizarán en las pruebas de liberación (como los medios embotellados para la prueba de esterilidad) requieren esterilización después de la preparación. Los medios embotellados generalmente se esterilizan en autoclave; mientras que los medios de placa se dispensan normalmente en condiciones de clase 5 ISO 14644 y, para los medios utilizados en salas blancas, las placas se esterilizan por irradiación. ^(19, 64)

Para los medios utilizados para las pruebas en el laboratorio de microbiología, como las pruebas de biocarga, los medios no suelen ser irradiados. Con la esterilización de medios embotellados, esto se lleva a cabo típicamente en una autoclave de vapor a temperaturas entre 121-134 ° C. ^(19, 64)

Sin embargo, el ciclo debe desarrollarse teniendo en cuenta no solo la esterilización sino también evitar daños al medio a través del proceso de calentamiento. El tratamiento térmico de los medios de cultivo, que contienen péptidos, azúcares, minerales y metales, puede provocar la destrucción de nutrientes si el calor es demasiado alto. Esto ocurre por degradación térmica directa o por reacción entre los componentes del medio. ^(19, 64)

Por lo tanto, es importante optimizar el proceso de calentamiento para que un medio sea estéril después del calentamiento pero se cause un daño mínimo a los ingredientes del medio. Para esto, el ciclo de autoclave ideal es un proceso de corta duración y alta temperatura diseñada para ser más letal para los microorganismos y menos dañino químicamente; esto en comparación con ciclos que son más largos y de procesos de temperatura más baja. Por lo tanto, un ciclo de tres minutos de duración a una temperatura de 134 ° C es preferible a uno que dura 20 minutos a 115 ° C. En ocasiones, los fabricantes de medios de cultivo proporcionan orientación sobre combinaciones adecuadas de tiempo y temperatura. Sin embargo, es importante tener en cuenta que las autoclaves varían en rendimiento. ^(19, 64)

Por esta razón, se deben realizar pruebas de termopar con diferentes volúmenes de medios para determinar los tiempos de "calentamiento y enfriamiento". Tal tarea también es necesaria cuando se preparan volúmenes mayores a los recomendados por el fabricante. En tales casos, para evitar el sobrecalentamiento de las unidades de gran volumen de los medios, los períodos de "calentamiento" y "enfriamiento" normalmente se integran en la temperatura recomendada por el fabricante. Después de la esterilización, los medios líquidos, esterilizados en su contenedor final, se deben enfriar a la temperatura ambiente lo más rápido posible, idealmente bajo un flujo de aire unidireccional. ^(53, 67)

Las tapas de los tornillos se deben apretar y el medio debe mantenerse en la oscuridad. Los recipientes de medio de agar que han sido esterilizados deben mantenerse en la oscuridad para su posterior fusión o colocarse directamente en un baño de agua y el medio dispensado tan pronto como alcance una temperatura entre 42 y 48°C, o dentro de un período máximo de tiempo (esto se discute a continuación). Antes del uso, el medio debe mezclarse completamente, sin formación de burbujas antes de la dispensación aséptica. Con algunos medios de cultivo, los suplementos estériles lábiles al calor deben agregarse al medio después de que se haya enfriado a alrededor de 50 ° C. Para esto, se debe permitir que el suplemento alcance la temperatura ambiente y luego se agrega al medio de agar. La temperatura del suplemento es importante ya que los líquidos muy fríos pueden hacer que el agar gelifique o forme copos transparentes que se puedan ver fácilmente. Por ejemplo, en agar enriquecido con sangre. El mayor cuidado debe tomarse con sangre. La sangre (típicamente sangre desfibrinada de oveja o vaca) se mantiene a 2-8 °C (la sangre no debe congelarse) y luego se calienta gradualmente a 35 ° C (normalmente a través de una incubadora). ^(56, 68)

La mezcla adecuada es esencial para garantizar la aireación de la sangre, y como resultado, las placas de sangre pobremente oxigenadas aparecen de color morado (a diferencia del agar sangre aireado correctamente, que es de color rojo cereza). Los suplementos deben mezclarse en el medio de forma cuidadosa y minuciosa, y luego distribuirse en los contenedores finales lo más rápido posible. ^(56, 68)

2.3.4. Siembra y Aislamiento Bacteriano

Para la detección efectiva del contenido bacteriano de las muestras, es importante lograr el crecimiento de las colonias individuales mediante el uso de una buena técnica para inocular en los medios de cultivo. ^(21, 56)

Hay muchas variaciones y preferencias personales para "plaquear". Todos los medios de cultivo deben verificarse antes de su uso para determinar la fecha de contaminación y caducidad. Los medios de cultivo deben tener un lote identificable o un número de control de calidad y han pasado las pruebas de control de calidad antes de su uso. Las placas que están más allá de su fecha de caducidad, las placas contaminadas y los medios de caldo que aparecen inusualmente turbios deben descartarse. (21, 56)

El área inicial inoculada debe cubrir entre un cuarto y un tercio del área total de agar utilizada. Se pueden usar placas enteras, medias placas o cuarterones dependiendo de las circunstancias. Las muestras se pueden colocar en placas para colonias individuales, o se pueden sembrar directamente sobre un segmento completo de una placa y se pueden incubar sin propagación adicional. Los aros de alambre se deben flamear sosteniéndolos con el extremo del lazo hacia abajo en una llama Bunsen hasta que el lazo y el cable entero alcancen el calor rojo. Coloque sobre una rejilla para que se enfríe antes de usar. Esto debe hacerse antes y después del uso y entre placas de agar. (21, 59)

Es habitual utilizar dos bucles, para permitir un enfriamiento adecuado de uno después de flamear mientras el otro está en uso. Se deben usar diferentes lazos desechables para cada plato. Para una muestra potencialmente muy contaminada, el ciclo debe ser flameado entre cada serie de rayas, o el ciclo puede rotarse para formar la siguiente serie de rayas con el lado no utilizado del ciclo. Para el análisis semicuantitativo de la orina, el ciclo no debe flamearse de esta manera. (59). Todos los medios deben incubarse tan pronto como sea posible después de la inoculación. Las placas para la incubación anaeróbica se deben incubar lo antes posible para evitar la pérdida de viabilidad (<15 minutos). Después de la inoculación, la muestra, o una parte de ella, debe conservarse durante al menos 48 horas después de que el laboratorio haya emitido el informe final. (21, 59)

La mayoría de las placas de cultivo positivas se pueden descartar dentro de las 24-48 horas posteriores a la emisión de un informe final autorizado. Las culturas de particular valor epidemiológico pueden conservarse durante más tiempo, ya que los organismos pueden necesitar más trabajo o derivarse a un laboratorio de referencia. Las láminas de microscopio de rutina teñidas deben conservarse durante siete días después de la publicación del informe final. Los portaobjetos para el examen de especies de *Mycobacterium* deben mantenerse encerrados en condiciones de nivel 3 hasta que se emita el informe final del espécimen. Los cultivos positivos de especies de *Mycobacterium* deben conservarse en un armario cerrado con llave en un laboratorio de Categoría 3 hasta que se reciba el informe final del Laboratorio de Referencia. ^(21, 59)

Por su parte, el aislamiento se refiere a la separación de una cepa de una población natural mixta de microbios, presentes en el medio ambiente, por ejemplo, en agua o flora del suelo, o de seres vivos con flora cutánea, flora oral o flora intestinal, con el fin de identificar el microbio de interés. Históricamente, las técnicas de laboratorio de aislamiento se desarrollaron primero en el campo de la bacteriología y la parasitología (durante el siglo XIX), antes que en virología durante el siglo XX. Los métodos de aislamiento microbiano han cambiado drásticamente en los últimos 50 años, desde una perspectiva laboral con una mecanización cada vez mayor, y con respecto a la tecnología involucrada, y, por lo tanto, la velocidad y precisión. ^(21, 56)

2.3.5. Metabolismo Bacteriano

Se refiere a todas las reacciones bioquímicas que ocurren en una célula u organismo. Se centra en la diversidad química de las oxidaciones del sustrato y las reacciones de disimilación (reacciones por las cuales las moléculas del sustrato se descomponen), que normalmente funcionan en las bacterias para generar energía. ⁽⁵⁷⁾

También dentro del alcance del metabolismo bacteriano está el estudio de la captación y utilización de los compuestos inorgánicos u orgánicos requeridos para el crecimiento y mantenimiento de un estado de equilibrio celular (reacciones de asimilación). Estas respectivas reacciones exergónicas (que producen energía) y endergónicas (que requieren energía) se catalizan dentro de la célula bacteriana viva mediante sistemas enzimáticos integrados, siendo el resultado final la autorreplicación de la célula. La capacidad de las células microbianas para vivir, funcionar y replicarse en un medio químico apropiado (como un medio de cultivo bacteriano) y los cambios químicos que resultan durante esta transformación constituyen el alcance del metabolismo intermediario de las células vegetativas bacterianas. ⁽⁵⁷⁾

La célula bacteriana es un transformador de energía altamente especializado. La energía química generada por las oxidaciones del sustrato se conserva mediante la formación de compuestos de alta energía como el adenosín difosfato (ADP) y el trifosfato de adenosina (ATP) o compuestos que contienen el enlace tioéster (acetilo SCoA) o succinil SCoA. ADP y ATP representan monofosfato de adenosina (AMP) más uno y dos fosfatos de alta energía ($AMP \sim P$ y $AMP \sim P \sim P$, respectivamente); la energía se almacena en estos compuestos como enlaces de fosfato de alta energía. En presencia de sistemas enzimáticos adecuados, estos compuestos se pueden usar como fuentes de energía para sintetizar los nuevos compuestos orgánicos complejos que necesita la célula. Todas las células vivas deben mantener reacciones bioquímicas en estado estable para la formación y el uso de tales compuestos de alta energía. ⁽⁵⁷⁾

Kluyver y Donker (1924 a 1926) reconocieron que las células bacterianas, independientemente de la especie, eran en muchos aspectos similares químicamente a todas las demás células vivas. Por ejemplo, estos investigadores reconocieron que la transferencia de hidrógeno es una característica común y fundamental de todos los procesos metabólicos. ⁽⁵⁷⁾

Las bacterias, como las células de mamíferos y de plantas, usan ATP o el enlace de fosfato de alta energía (~ P) como la principal fuente de energía química. Las bacterias también requieren las vitaminas del complejo B como coenzimas funcionales para muchas reacciones de oxidación-reducción necesarias para el crecimiento y la transformación de la energía. ⁽⁵⁷⁾

Un organismo como *Thiobacillus thiooxidans*, cultivado en un medio que contiene solo azufre y sales inorgánicas, sintetiza grandes cantidades de tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, piridoxina y biotina. Por lo tanto, Kluver propuso la teoría de la unidad de la bioquímica (Die Einheit in der Biochemie), que establece que todas las reacciones enzimáticas básicas que apoyan y mantienen los procesos de vida dentro de las células de los organismos tienen más similitudes que diferencias. Este concepto de unidad bioquímica estimuló a muchos investigadores a usar bacterias como sistemas modelo para estudiar reacciones bioquímicas eucarióticas, vegetales y animales relacionadas que son esencialmente "idénticas" a nivel molecular. Desde un punto de vista nutricional o metabólico, existen tres tipos fisiológicos principales de bacterias: los heterótrofos (o quimioorganótrofos), los autótrofos (o quimiolitótrofos) y las bacterias fotosintéticas (o fotótrofos). ⁽⁵⁷⁾

2.3.6. *Staphylococcus aureus*

2.3.6.1. Generalidades

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia micrococaceae, al Gram presentan una morfología de cocos de color azul-morado, se encuentran agrupados formando racimos de uvas, no poseen cápsulas, ni son esporulados y carecen de flagelos, son anaeróbios facultativos. Producen catalasa, es decir son capaces de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre; esta característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos. ⁽⁵⁹⁾

Este microorganismo es oportunista forma parte de la flora bacteriana humana, puede contaminar ropa de cama o vestimenta. Su virulencia se debe a un material enzimático y de toxinas, entre las patologías que producen están entre otros, la bacteriemia, osteomielitis, endocarditis y septicemia. ^(18, 57)

Actualmente, la prevalencia de bacteriemia por los estafilococos ha aumentado significativamente a nivel clínico, específicamente la especie *Staphylococcus aureus*, que se ha convertido en la principal causa de infecciones en el torrente circulatorio e intoxicaciones ocasionadas por alimentos. ⁽¹⁹⁾

2.3.6.2. Aislamiento e identificación

El aislamiento e identificación del *Staphylococcus aureus* se realiza en medios de cultivo como Agar Sangre, Agar Nutritivo y Agar Manitol Salado, los cuales se someten a incubación a 36°C por 24 – 48 horas formando colonias de color amarillo – dorado en Agar Sangre y Agar Nutritivo y en el caso del agar Manitol Salado, se aprecia la fermentación de manitol de color amarillo. Las colonias son de naturaleza cremosa, lisas, elevadas y de borde entero; producen en agar Sangre β -hemólisis es decir hemolisan completamente a los glóbulos rojos. La especie patógena es el *Staphylococcus aureus*, debido a que presenta la enzima coagulasa la cual se manifiesta por coagular el plasma, la especie es resistente a la desecación y desarrolla fácilmente en medios con altas concentraciones de cloruro de sodio 7.5%. ⁽²²⁾

La identificación del *Staphylococcus aureus*, se realiza de forma microscópica utilizando la técnica de Gram, algunas pruebas bioquímicas como: Catalasa e hidrólisis de los ácidos nucleicos (DNASA) que permite diferenciar al género *Staphylococcus* del género *Micrococcus*. ⁽²²⁾

2.3.7. *Escherichia coli*

2.3.7.1. Generalidades

Es una especie que se encuentra en el tracto gastrointestinal de los seres vivos y presenta algunas funciones como la de producir vitamina K. Se utiliza como indicador de contaminación fecal en los análisis de agua y alimentos. Pertenece a la familia de la Enterobacteriaceae, es mesófila, desarrolla a 37°C, soporta temperaturas bajas y su presencia en alimentos congelados no elimina a la bacteria, por el contrario la especie es sensible a temperaturas mayores a 70°C, se desarrolla plenamente a un pH de 7. Valores mayores o menores del pH, se consideran como factor de protección debido a que el microorganismo no se desarrollaría. ⁽²⁵⁾

2.3.7.2. Aislamiento e identificación

Para el aislamiento e identificación de la cepa de *Escherichia coli*, se utilizan medios de cultivo y se aplican métodos in vivo e in vitro y de biología molecular:

En la actualidad se utilizan una serie de medios de cultivo como el Agar Mac Conkey, Agar Eosina – Azul de Metileno, Agar Desoxicolato Lactosa entre otros, los cuales son selectivos y diferenciales para enterobacterias. Se someten a 37°C por 24 – 48 horas. ^(25, 57)

De verificarse el desarrollo bacteriano en los medios de cultivo en placa, se continúa con la identificación en medio de diferenciación bioquímica, en los cuales y haciendo uso de una serie de tablas de identificación bioquímica para la lectura de los medios como TSI (Triple Azúcar Hierro Agar), LIA (Lisina Hierro Agar), MIO, citrato, malonato, caldo manitol-rojo de fenol, se procederá a la denominación de la especie estudiada. ^(21, 57)

En los medios de diferenciación bioquímica, se pueden realizar las diversas interpretaciones teniendo en cuenta el metabolismo bioquímico de las Gram negativas. ⁽⁵⁷⁾

2.4. Formulación de hipótesis

2.4.1. Hipótesis general:

1. El efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellífera* del Agar FLYM en la detección de contaminantes bacterianos es Buena.

2.4.2. Hipótesis específicas:

1. Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellífera* tienen metabolitos primarios y secundarios.
2. El efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellífera* del Agar FLYM en la detección de *Staphylococcus aureus* es Buena.
3. El efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellífera* del Agar FLYM en la detección de *Escherichia coli* es Buena.

2.5. Operacionalización de variables e indicadores

Tabla N° 09: Operacionalización de variables

OPERACIONALIZACION DE VARIABLES			
V1: INDEPENDIENTE	DIMENSION	INDICADORES	
Efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de <i>Apis mellífera</i> del Agar FLYM	Fitoquímica	Solubilidad	
		Compuestos Químicos.	
V2: DEPENDIENTE	DIMENSION	INDICADORES	
Detección de contaminantes bacterianos	Aislamiento.	BUENA	80 – 100%
		REGULAR	60 – 79%
		MALA	50 – 59%
	Visualización de la Morfología de la Colonia.	BUENA	80 – 100%
		REGULAR	60 – 79%
		MALA	50 – 59%

2.6. Definición de términos básicos

- **Validación:** Acción y efecto de validar. Es el proceso para confirmar que el procedimiento analítico utilizado para una prueba en concreto es adecuado para su uso previsto.
- **Extracto:** Es una sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima, a menudo usando un solvente como etanol o agua.
- **Inhibidor:** Sustancia que bloquea o retrasa una reacción o función.
- **Medio de Cultivo:** Es un producto de laboratorio que consta de un gel o una solución que contiene los nutrientes necesarios que permite en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de determinados microorganismos.
- **Microorganismo:** También llamado microbio u organismo microscópico, es un ser vivo que sólo puede visualizarse con el Microscopio.
- **Agar – Agar:** Es una sustancia gelatinosa no animal de origen marino, constituido de un polisacárido sin ramificaciones obtenido de la pared celular de varias especies de algas de los géneros Gelidium.
- **pH:** Es una medida de acidez o alcalinidad de una disolución. El pH indica la concentración de iones hidrógeno presentes en determinadas disoluciones.
- **Temperatura:** Es una magnitud referida a las nociones comunes de calor medible mediante un termómetro.
- **Osmosis:** Es un proceso físico – químico que hace referencia al pasaje de un disolvente, aunque no de soluto, entre dos disoluciones que están separadas por una membrana con características de semipermeabilidad.

- **Antibiótico:** Es la sustancia química producida por un ser vivo o fabricada por síntesis, capaz de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos, por su acción bacteriostática, o de causar la muerte de ellos, por su acción bactericida.
- **Siembras:** Procedimiento técnico que consiste en colocar una pequeña fracción o volumen de la muestra, sobre o dentro, de uno o varios medios de cultivo que contengan los nutrientes necesarios para las especies que presuntivamente contiene, con la finalidad de que puedan desarrollarse adecuadamente, para ayudar a su estudio y posterior identificación
- **Rojo de Fenol:** Es un compuesto orgánico usado en laboratorio como indicador de pH.
- **Autoclave:** Trabaja con vapor de agua, de paredes gruesas con un cierre hermético que permite trabajar a alta presión para realizar una reacción industrial, una cocción o una esterilización. Su construcción debe ser tal que resista la presión y temperatura desarrollada en su interior.
- **Buffer:** Es una mezcla en concentraciones relativamente elevadas de un ácido y su base conjugada, es decir, sales hidrolíticamente activas. Tienen la propiedad de mantener estable el pH de una disolución frente a la adición de cantidades relativamente pequeñas de ácidos.
- **Incubación:** Es un dispositivo que sirve para mantener y hacer crecer cultivos microbiológicos o cultivos celulares. La incubadora mantiene la temperatura, la humedad y otras condiciones en grado óptimo, tales como el contenido de dióxido de carbono (CO₂) y de oxígeno en su atmósfera interior.
- **Azul de Bromotimol:** Compuesto químico derivado del trifenilmetano. Se utiliza para detectar el pH. Puede adoptar diferentes colores. Amarillo o fucsia (sobre una solución ácida) y verde o azul (en una solución básica).

- **Inoculación:** Es el proceso por el cual el material infeccioso se introduce en un cultivo o en un cuerpo por una herida en la piel o en una mucosa.
- **Indicador de pH:** Es una sustancia que permite medir el pH de un medio. Habitualmente, se utilizan como indicador de las sustancias químicas que cambian su color al cambiar el pH de la disolución. El cambio de color se debe a un cambio estructural inducido por la protonación o desprotonación de la especie. Los indicadores Ácido-base tienen un intervalo de viraje de una unidad arriba y otra abajo de pH, en la que cambian la disolución en la que se encuentran de un color a otro, o de una disolución incolora, a una coloreada.
- **Filtración:** Proceso mediante el cual un elemento es colocado a través de un tipo de tamiz o filtro por el cual se separan sus partes, quedando retenidas aquellas partes que no pasan por su tamaño y siendo filtradas aquellas que sí pasan por el espacio del filtro.

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1. Tipo y nivel de la investigación

Tipo

Investigación aplicada por que mediante la sinergia de los metabolitos primarios y secundarios de la Miel y Propóleo de *Apis mellifera*, se preparará un medio de cultivo denominado Agar Flym para detectar contaminantes bacterianos. ^(26, 50)

Nivel de Investigación

Experimental: Mediante la sinergia de los metabolitos primarios y secundarios de la Miel y Propóleo de *Apis mellifera* y de la recolección de las cepas, teniendo en cuenta condiciones rigurosamente controladas se aislará y visualizará la morfología de las colonias de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. ^(26, 50)

3.2. Diseño de la Investigación

En relación al diseño experimental, se desarrollará de la siguiente manera:

3.2.1. Material Biológico

Se trabajará con 100 gramos de Miel, los cuales se disolverán y filtrarán y 100 gramos de propóleo, al cual se le someterá a congelación y mediante su extracción por trituración y posterior maceración en alcohol al 96%, se obtendrá una solución 100% puro y natural. ^(8, 16, 17)

3.2.2. Materiales e Instrumentos de Laboratorio

- | | |
|---------------------------|--------------|
| - Tubo de Ensayo 13 X 100 | 30 Unidades. |
| - Pipeta 1 ml | 05 Unidades. |
| - Probeta de 100 ml | 08 Unidades. |

- Matraz 250, 500 ml	05 Unidades.
- Bagueta	07 Unidades.
- Beaker 250 ml	06 Unidades.
- Balón 250 ml	05 Unidades.
- Placa Petri 15 X 100 mm	96Unidades.
- Frasco Ámbar con Tapa esmerilada	05 Unidades.
- Mechero Bunsen	04 Unidades.
- Trípode	03 Unidades.
- Rejilla de Asbesto	03 Unidades.
- Asa de Khole	04 Unidades.
- Gradilla	05 Unidades.
- Espátula	04 Unidades.
- Micropipeta 0,5 - 10ul; 50ul – 200 ul.	03 Unidades.
- Balanza Analítica OHAUS	01 Unidad.
- Baño María Memmert Mod Typ WB 10	02 Unidad.
- Horno Memmert Mod Typ Tv 200	02 Unidad.
- Autoclave Nacional de 801	01 Unidad.
- Refrigerador	02 Unidad.
- Incubadora Memmert Mod Typ BE 200	02 Unidad.
- Microscopio	03 Unidad.
- Hot Plate	02 Unidad.
- Licuadora	02 Unidad.
- Alcohólimetro	01 Unidad.
- Estabilizador	01 Unidad.

3.2.3. Reactivos químicos

- Alcohol 96°	0.8 Litros.
- Metanol	0.6 Litros.
- Agua destilada	3.0 Litros.
- Ácido clorhídrico 10%	0.2 Litros.
- Ácido sulfúrico concentrado	0.2 Litros.
- Amoniaco	0.2 Litros.
- Cloroformo	0.4 Litros.

- Sulfato de sodio	22 Gramos.
- Tricloruro de fierro.	22 mL
- Draguendorff.	22 mL
- Shinoda.	22 mL
- Lieberman burchard.	22 mL
- Borntranger.	22 mL
- Ninhidrina.	22 mL
- Gelatina.	20 mL
- Molish.	22 mL
- Mayer.	22 mL
- Fehling.	25 mL
- Rosenheim.	23 mL
- Cristal Violeta.	105 mL
- Safranina.	105 mL
- Lugol.	105 mL
- Acetona.	105 mL
- Aceite de Inmersión.	15 mL
- Alcohol Isopropílico.	106 mL
- Yodo.	107 mL
- Yoduro de Potasio.	108 mL
- Mezcla Sulfocrómica.	220 mL
- Alcohol Amílico.	110 mL
- Peptona de Caseína.	60 Gramos

3.2.4. Estudio fitoquímico

Con respecto al estudio Fitoquímico se utilizará la información del Libro Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de Productos Naturales de OLGA LOCK DE UGAZ. ^(8, 16, 17)

3.2.5. Estudio macroscópico

El estudio macroscópico consta de varios pasos a seguir para la preparación de medios de cultivo.

Agar Miel y Propóleo de *Apis mellífera* (FLYM):

- | | |
|----------------------|--------------|
| - Miel de Abeja | 3.0 Gramos. |
| - Propóleo | 1.5 Gramos. |
| - Agar – Agar | 1.2 Gramos. |
| - Cloruro de Sodio | 0.5 Gramos. |
| - Azul de Bromotimol | 0.01 Gramos. |
| - pH Final | 7.2 +/- 0.2. |

Procedimiento:

- Pesar todos los ingredientes a excepción del Agar – Agar y disolver en 100 mL de agua destilada.
- Homogenizar y Reposar por 5 minutos.
- Adicionar el Agar – Agar y Homogenizar en Baño María a 65°C por 10 minutos.
- Verificar que no exista grumos.
- Verificar el pH.
- Verificar que el volumen se mantenga en 100 mL.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Dispensar en placas petri estériles frente llama de mechero.
- Luego enfriar y conservar en refrigeradora a 4°C.

3.3. Población y muestra de la investigación

Población:

Se basa en muestras clínicas patológicas que se analizarán durante los meses de Octubre, Noviembre y Diciembre 2017 y Enero del 2018 en el Área de Microbiología del Laboratorio Biológico y Análisis Clínico Santa Rosa de Pachacamac E.I.R.L; de las cuales se aislaran cepas bacterianas identificadas como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Muestra:

La muestra de estudio se basa en cepas bacterianas identificadas en el Laboratorio Biológico y Análisis Clínico Santa Rosa de Pachacamac E.I.R.L como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y para determinar el tamaño de muestra se utilizará el muestreo proporcional cuya fórmula es:

$$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot q \cdot N}{e^2 \cdot (N - 1) + p \cdot q \cdot Z^2}$$

Donde Z^2 = intervalo de confianza (0.95) o 95% Valor tabular: $(1.96)^2 = 3.8416$

P = proporción de aciertos (0.50)

Q = proporción de desaciertos (1 – p)

N = población total: 5

e^2 = margen de error calculado (0.035) o $(3.5\%)^2 = 0.001225$

m = muestra: 4.97

Criterios de inclusión

Todas las muestras clínicas patológicas de pacientes que se atendieron en el Laboratorio Biológico y Análisis Clínico Santa Rosa de Pachacamac E.I.R.L; durante Octubre, Noviembre, Diciembre 2017 y Enero del 2018 y de los cuales se aislaron en el Área de Microbiología cepas identificadas como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Criterios de exclusión

Muestras clínicas de pacientes con previa administración de Antibióticos.

3.4. Técnicas e Instrumentos de recolección de datos

3.4.1. Descripción de los instrumentos

Se empleó el método observacional para la recolección de la información, mediante la cual se apuntaron los datos de la investigación en tablas, desde el estudio fitoquímico hasta los resultados finales, los que se utilizaron para alcanzar el objetivo principal del estudio.

Del mismo modo, los instrumentos (ad-hoc) fueron: tabla N° 12: Solubilidad, donde se utilizaron solventes; tabla N° 13: Identificación de metabolitos, donde se comprobó la presencia de compuestos químicos y las tablas 14 y 15: Evaluación de los medios, donde se comprobó el aislamiento y visualización de la morfología de la colonia bacteriana. (Ver anexo 02)

3.4.2. Validación de Instrumentos

Los instrumentos empleados fueron confeccionados por los bachilleres autores del Proyecto de Investigación. Los instrumentos fueron validados, mediante la técnica de juicio de expertos. Las tablas se realizaron en base a los indicadores con sus respectivos criterios. En la validación realizada por el juicio de expertos, se tuvo una mínima y máxima calificación (ver anexo 05).

Los expertos fueron tres químico farmacéuticos, que ostentan el grado académico de magister y cuentan con una amplia experiencia en la investigación.

Tabla N° 10: Resumen de resultados de Juicio de Expertos

JUEZ EXPERTO	RESULTADOS	CONDICIÓN
Mg. Mario Pineda Pérez.	90 – 100%	Válido, Aplicar.
Mg. Luis Aranguren Belaunde.	90 – 100%	Válido, Aplicar.
Mg. Oscar Bernuy Flores López.	90 – 100%	Válido, Aplicar.

El resultado de la evaluación realizada por el Juicio de Expertos, dio como resultado que el instrumento fuese considerado válido y aplicable.

3.5. Técnicas para el procesamiento de datos

Los datos obtenidos fueron analizados en el programa Excel.

3.6. Procedimiento experimental

3.6.1. Obtención de los nutrientes

Se recolectaron 1 kilo de Miel de Abeja y 500 gramos de Propóleo. Las muestras, se depositaron en frascos de vidrio de 500 mL, boca ancha tapa rosca de Pyrex, los cuales previamente fueron esterilizados en autoclave a 121°C; posteriormente se envolvieron en papel kraft y se colocaron en cajas de cartón con tecnopor en su interior y con rótulo.

Las muestras se llevaron al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, donde se eliminaron restos de abejas y partículas extrañas presentes en ambas muestras.

Se utilizaron 100 gramos de Miel de Abeja y 100 gramos de Propóleo; el Propóleo fue llevado a congelación por 24 horas, lo que facilitó su procesamiento y posterior tratamiento en trozos pequeños y rallados; luego se maceró en alcohol al 96° por 20 días, después se sometió a filtración, deshidratación y secado a una temperatura de 40°C por 50 horas, para luego, pasar por envase de vidrio estéril, obteniéndose 40 gramos de melcocha de Propóleo. (Ver anexo: 02).

3.6.2. Solubilidad y análisis de compuestos químicos (metabolitos)

Las muestras se sometieron a pruebas de solubilidad en diversos reactivos teniendo en cuenta su polaridad, con el fin de determinar el solvente para la formulación de los medios de cultivo. (Anexo 02).

Posteriormente, las muestras se sometieron con reactivos químicos de coloración y precipitación para lo cual se agregó a cada tubo de ensayo 2 - 3 gotas de las mismas y agregamos 3 gotas de reactivo. (Anexo 02).

TABLA N° 11: Determinación de metabolitos

N°	METABOLITO	ENSAYO	REACCIÓN POSITIVA	PROCEDIMIENTO
1	Carbohidratos	Molish.	Anillo violeta.	X gotas de MP + III gotas de Reactivo de Molish agitar + III gotas de H ₂ SO ₄ cc
		Antrona.	Coloración verde.	X gotas de MP + III gotas de Reactivo de Antrona.
		Fehling.	Precipitado rojo ladrillo.	X gotas de MP + III gotas de Fehling A+ III gotas de Fehling B + calentar en B.M.
2	Compuestos Fenólicos	FeCl ₃ .	Coloración verde o azul.	X gotas de MP + III gotas de FeCl ₃ 10%
3	Taninos	Gelatina.	Precipitado denso blanco.	X gotas de MP + III gotas de gelatina.
4	Antocianinas y Flavonoides Catéquicos	Rosenheim.	Coloración rojo oscuro.	X gotas de MP + III gotas de Reactivo Rosenheim.
5	Flavonoides	Shinoda.	Chalconas, auronas, isoflavanonas: No hay coloración.	X gotas de MP + 1-2 virutas de Mg metálico + III gotas de HCl cc
			Isoflavonas: Amarillo rojizo.	
			Flavanonoles: Rojo a magenta.	
			Flavonas y flavonoles: Amarillo a rojo.	
6	Aminoácidos Libres y Grupos Amino	Ninhidrina.	Coloración violácea.	X gotas de MP + III gotas de Reactivo Ninhidrina + calentar en B.M. 10 min.
7	Alcaloides	Dragendorff.	Precipitado naranja.	X gotas de MP + evaporar el solvente B.M. + V gotas de HCl 10%+ III gotas de Reactivo de Dragendorff.
		Mayer.	Precipitado blanco.	X gotas de MP + evaporar el solvente B.M. + V gotas de HCl 10%+ III gotas de Reactivo de Mayer.
		Bertrand.	Precipitado blanco.	X gotas de MP + evaporar el solvente B.M. + V gotas de HCl 10%+ III gotas de Reactivo de Bertrand.
		Sonnenschein.	Precipitado amarillo-verdoso.	X gotas de MP + evaporar el solvente B.M. + V gotas de HCl 10%+ III gotas de Reactivo de Sonnenschein.
8	Naftaquinonas, Antraquinonas y Antranonas	Borntranger.	Coloración roja.	X gotas de MP + III gotas de Reactivo de Borntranger.
9	Triterpenoides y Esteroides	Lieberman-Burchard.	Esteroides: Verde-azul.	X gotas de MP + llevar a sequedad en B.M. + X gotas de cloroformo+ III gotas de anhídrido acético+ H ₂ SO ₄ cc en zona (por las paredes de tubo) sin agitar.
			Triterpenoides: Rojo-naranja.	
10	Saponinas	Espuma.	0.5 a 1 cm estable por 15 min.	1 mL de MP + 5 mL de agua destilada + agitar fuertemente por 1 min.
11	Glicósidos	Baljet.	Coloración anaranjada.	X gotas de MP + V gotas de Ácido pícrico 1 % + V gotas de NaOH al 5 %.
12	Lactonas	Legal.	Coloración rojo oscuro.	X gotas de MP + V gotas de Nitroprusiato de sodio 0.5% + V gotas de KOH 2N.
13	Cumarinas	NaOH 10%.	Fluorescencia celeste.	X gotas de MP + papel humedecido con NH ₄ OH cc en boca de tubo + calentar por 5 a 10 min en B.M.

3.6.3. Reactivación de las bacterias

Para la reactivación de las bacterias denominadas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y de *Escherichia coli* ATCC 8739, se atemperaron los tubos de ensayo que contenían las cepas bacterianas a temperatura ambiente durante 3 horas.

Del mismo modo, con la ayuda del asa de siembra se inoculó parte de las cepas a los tubos de ensayo que contenían 4 mL de caldo infusión cerebro corazón para realizar la reactivación de los mismos, para luego proceder a la incubación a una temperatura de 37°C por 18 horas. (Ver anexo: 04).

3.6.4. Siembra y Aislamiento

Se procedió a la preparación del Agar Nutritivo (Merck) y del Agar Flym; posteriormente se procedió a efectuar la siembra de las bacterias en estudio, con la finalidad de apreciar el crecimiento bacteriano. Para la realización de los procesos microbiológicos fue necesario utilizar las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica. Se trabajó cerca de un mechero de Fischer (no más de 18 cm. de distancia). (56, 59, 65, 67, 68).

Las muestras se sembraron mediante la técnica de estrías por agotamiento, luego las placas se incubaron de manera invertida, debido a que el agua que se encuentra en los medios de cultivo puede provocar condensación durante la incubación a 37°C y si se recibe sobre la superficie del agar, se extiende dando como resultado la no apreciación de las colonias bacterianas. (56, 59, 65, 67, 68).

En los medios de cultivo formulados y preparados, se procedieron a sembrar las cepas bacterianas en estudio, los cuales brindaron de forma viable colonias bacterianas. (56, 59, 65, 67, 68).

CAPÍTULO IV PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. Presentación de resultados

Prueba de solubilidad

Los resultados fueron los siguientes:

Tabla N° 12: Prueba de solubilidad

N°	Solventes	Nomenclatura	Interpretación	
			Miel de Abeja	Propóleo
1.	Acetato de etilo	EtOAc	++	+
2.	Acetona	Me ₂ CO	+	-
3.	Agua destilada	H ₂ O	++++	-
4.	Cloroformo	CHCl ₃	-	++
5.	Etanol	Et(OH)	++	+++
6.	Éter de petróleo	EP	-	-
7.	Éter etílico	Et ₂ O	+	+
8.	Metanol	MeOH	+	+
9.	n - butanol	n.buOH	-	-
10.	n - Hexano	Hex	-	+

LEYENDA:

- Insoluble (-)
- Ligeramente Soluble (+)
- Soluble (+++)
- Muy Soluble (++++)

FUENTE: Elaboración propia.

En prueba de solubilidad la Miel de Abeja fue muy soluble en agua y en el caso del Propóleo se determinó que la mayor solubilidad fue con etanol.

Identificación de metabolitos

Tabla N° 13: Identificación de metabolitos

N°	METABOLITO	ENSAYO	REACCIÓN POSITIVA	Interpretación	
				Miel de Abeja	Propóleo
1	Carbohidratos	Molish.	Anillo violeta.	+++	+
		Antrona.	Coloración verde.	+	-
		Fehling.	Precipitado rojo ladrillo.	+	-
2	Compuestos Fenólicos	FeCl ₃ .	Coloración verde o azul.	++	+++
3	Taninos	Gelatina.	Precipitado denso blanco.	+	++

FUENTE: Elaboración propia.

Tabla N° 13: Identificación de metabolitos (continuación)

N°	METABOLITO	ENSAYO	REACCIÓN POSITIVA	Interpretación	
				Miel de Abeja	Propóleo
4	Flavonoides	Shinoda.	Chalconas, auronas, isoflavanonas: No hay coloración.	+	+
			Isoflavonas: Amarillo rojizo.	-	-
			Flavanoles: Rojo a magenta.	-	++
			Flavonas y flavonoles: Amarillo a rojo.	-	+
5	Antocianinas y Flavonoides Catéquicos	Rosenheim.	Coloración rojo oscuro.	-	+
6	Aminoácidos Libres y Grupos Amino	Ninhidrina.	Coloración violácea.	-	+
7	Alcaloides	Dragendorff.	Precipitado naranja.	+++	++
		Mayer.	Precipitado blanco.	++	++
		Bertrand.	Precipitado blanco.	++	++
		Sonnenschein.	Precipitado amarillo-verdoso.	++	++
8	Naftaquinonas, Antraquinonas y Antranonas	Borntrager.	Coloración roja.	-	+
9	Triterpenoides y Esteroides	Lieberman-Burchard.	Esteroides: verde-azul.	-	+
			Triterpenoides: rojo-naranja.	+++	++
10	Saponinas	Espuma.	0.5 a 1 cm estable por 15 min.	-	-
11	Glicósidos	Baljet.	Coloración anaranjada.	+++	++
12	Lactonas	Legal.	Coloración rojo oscuro.	-	-
13	Cumarinas	NaOH 10%.	Fluorescencia celeste.	-	-
<p>LEYENDA:</p> <ul style="list-style-type: none"> - No realizada (0) - Ausente (-) - Leve (+) - Moderado (++) - Abundante (+++) 					

FUENTE: Elaboración propia.

En cuanto a los resultados de la identificación de los metabolitos, se encontró alcaloides, triterpenoides, glicósidos y carbohidratos en la miel de abeja y compuestos fenólico, flavonoides, alcaloides, taninos y glicósidos en el Propóleo.

Medios de cultivo para el Desarrollo Bacteriano

Se realizó el diseño para preparación, siembra, aislamiento y posterior lectura de 80 placas petri, las cuales se reportan en la Tabla N° 14. Del total de placas petri que fueron sembrados, 20 corresponden a *Miel de Abeja* 3%, 20 a Propóleo 1.5%, 20 a Miel de Abeja 3% - Propóleo 1.5% y 20 al Agar Nutritivo (AN), las que se distribuyeron en 10 placas petri por cada tipo de cepa y medio.

Tabla N° 14: Número de placas Petri obtenidas según tipo de cepa y medio

N°	TIPO DE CEPA	AGARES				TOTAL
		AN	<i>Miel de Abeja</i>	<i>Propóleo</i>	<i>Miel de Abeja 3% - Propóleo 1.5%</i>	
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC N° 25923	10	10	10	10	40
2	<i>Escherichia coli</i> ATCC N° 8739	10	10	10	10	40
TOTAL		20	20	20	20	80

FUENTE: Elaboración propia.

El total de placas petri preparadas fueron 80, distribuyéndose según el tipo de cepa: 40 corresponden a *Staphylococcus aureus* ATCC N° 25923 y 40 a *Escherichia coli* ATCC N° 8739.

Los resultados de la evaluación macroscópica se presentan en las tablas 15 y 16, en las que se aprecian los dos criterios de evaluación que fueron; aislamiento y visualización de la morfología de la colonia bacteriana, dando como calificativo Buena para *Staphylococcus aureus* ATCC N° 25923 y *Escherichia coli* ATCC N° 8739, lo que significa que la calidad de los medios alternos registrados se encuentra en un intervalo de 80 a 100%.

En la tabla N° 15, se evaluó el agar *Miel de Abeja* 3% - *Propóleo* 1.5%, obteniéndose para *Staphylococcus aureus* N° ATCC 25923 un 90% de agares con el calificativo de Bueno y 10% de agares con calificativo de Regular y para el Agar Nutritivo 100 % Bueno.

Tabla N° 15: Estudio de los agares *Staphylococcus aureus* N° ATCC 25923.

AISLAMIENTO		AGAR		AGAR NUTRITIVO	
		Miel de Abeja 3% - Propóleo 1.5%		N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	09	90%	10	100%
REGULAR	60 – 79%	01	10%	00	00%
MALA	50 – 59%	00	00%	00	00%
TOTAL		10	100%	10	100%
VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LA COLONIA BACTERIANA		AGAR		AGAR NUTRITIVO	
		Miel de Abeja 3% - Propóleo 1.5%		N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	09	90%	10	100%
REGULAR	60 – 79%	01	10%	00	00
MALA	50 – 59%	00	00%	00	00
TOTAL		10	100%	10	100%

FUENTE: Elaboración propia.

En la tabla N° 16, se estudió el agar *Miel de Abeja 3% - Propóleo 1.5%*, obteniéndose para *Escherichia coli* N° ATCC 8739 un 90% de medios con el calificativo de Bueno y 10% Regular para los dos criterios de evaluación y para el Agar Nutritivo 100 % (Bueno).

TABLA N° 16: Estudio de los agares *Escherichia coli* N° ATCC 8739.

AISLAMIENTO		AGAR		AGAR NUTRITIVO	
		Miel de Abeja 3% - Propóleo 1.5%		N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	09	90%	10	100%
REGULAR	60 – 79%	01	10%	00	00%
MALA	50 – 59%	00	00%	00	00%
TOTAL		10	100%	10	100%
VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LA COLONIA BACTERIANA		AGAR		AGAR NUTRITIVO	
		Miel de Abeja 3% - Propóleo 1.5%		N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	09	90%	10	100%
REGULAR	60 – 79%	01	10%	00	00
MALA	50 – 59%	00	00%	00	00
TOTAL		10	100%	10	100%

FUENTE: Elaboración propia.

Se realizó la elaboración, distribución y siembra de 80 agares los cuales se reportan en la Tabla N° 17. Del total de agares que fueron preparados, 40 corresponden al Agar Nutritivo y 40 al agar *Miel de Abeja 3% - Propóleo 1.5%*, las que se distribuyeron en 04 agares por cada tipo de cepa de paciente y medio de cultivo.

Tabla N° 17: Cantidad de agares obtenidos según tipo de cepa de paciente y medio

N°	TIPO DE CEPA DE PACIENTE	AGARES		TOTAL
		Agar Nutritivo	Miel de Abeja 3% - Propóleo 1.5%	
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	4	4	8
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	4	4	8
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	4	4	8
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	4	4	8
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	4	4	8
6	<i>Escherichia coli</i>	4	4	8
7	<i>Escherichia coli</i>	4	4	8
8	<i>Escherichia coli</i>	4	4	8
9	<i>Escherichia coli</i>	4	4	8
10	<i>Escherichia coli</i>	4	4	8
TOTAL		40	40	80

FUENTE: Elaboración propia.

La cantidad de agares fueron 80, distribuyéndose según el tipo de cepa de paciente: 40 corresponden a *Staphylococcus aureus* y 40 a *Escherichia coli*.

Los resultados del estudio macroscópico de las cepas de los pacientes se presentan en las tablas N° 18 y N° 19, en las que se aprecian los dos criterios de evaluación que fueron; aislamiento y visualización de la morfología de la colonia bacteriana, dando como resultado para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* Bueno, lo que significa que la calidad de los medios registradas se encuentra en un intervalo de 80 a 100%.

En la tabla N° 18, se evaluó el agar *Miel de Abeja 3% - Propóleo 1.5%*, obteniéndose para *Staphylococcus aureus* un 90% de agares con el calificativo de Bueno y 10% de agares con calificativo de Regular y para el Agar Nutritivo 100 % (Bueno).

Tabla N° 18: Estudio de los agares *Staphylococcus aureus*

AISLAMIENTO		AGAR		AGAR NUTRITIVO	
		Miel de Abeja 3% - Propóleo 1.5%			
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	09	90%	10	100%
REGULAR	60 – 79%	01	10%	00	00%
MALA	50 – 59%	00	00%	00	00%
TOTAL		10	100%	10	100%
VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LA COLONIA BACTERIANA		AGAR		AGAR NUTRITIVO	
		Miel de Abeja 3% - Propóleo 1.5%			
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	09	90%	10	100%
REGULAR	60 – 79%	01	10%	00	00%
MALA	50 – 59%	00	00%	00	00%
TOTAL		10	100%	10	100%

FUENTE: Elaboración propia.

En la tabla N° 19, se estudió el agar *Miel de Abeja 3% - Propóleo 1.5%*, obteniéndose para *Escherichia coli* un 90% de medios con el calificativo de Bueno y 10% de medios con calificativo de Regular y para el Agar Nutritivo 100 % (Bueno).

Tabla N° 19: Estudio de los agares *Escherichia coli*

AISLAMIENTO		AGAR		AGAR NUTRITIVO	
		Miel de Abeja 3% - Propóleo 1.5%			
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	09	90%	10	100%
REGULAR	60 – 79%	01	10%	00	00%
MALA	50 – 59%	00	00%	00	00%
TOTAL		10	100%	10	100%
VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LA COLONIA BACTERIANA		AGAR		AGAR NUTRITIVO	
		Miel de Abeja 3% - Propóleo 1.5%			
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%	09	90%	10	100%
REGULAR	60 – 79%	01	10%	00	00%
MALA	50 – 59%	00	00%	00	00%
TOTAL		10	100%	10	100%

FUENTE: Elaboración propia.

4.2. Contrastación de hipótesis

Hipótesis específica 1:

- **H₁:** El efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellífera* del Agar FLYM en la detección de *Staphylococcus aureus* es considerado Bueno.
- **H₀:** El efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellífera* del Agar FLYM en la detección de *Staphylococcus aureus* no es considerado Bueno.
- Mediante el uso del agar *Miel de Abeja 3% - Propóleo 1.5%* del Agar FLYM para las cepas de *Staphylococcus aureus* un 90% de agares obtuvieron un calificativo de Bueno y 10% de agares con calificativo de Regular con relación al criterio aislamiento y visualización de la morfología de la colonia bacteriana.

En ambos casos se tuvo como referencia el Agar Nutritivo.

- **Decisión:** Por lo tanto, se acepta la hipótesis alterna (**H₁**).

Hipótesis específica 2:

- **H₂:** El efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellífera* del Agar FLYM en la detección de *Escherichia coli* es considerado Bueno.
- **H₀:** El efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellífera* del Agar FLYM en la detección de *Escherichia coli* no es considerado Bueno.
- Mediante el uso del agar *Miel de Abeja 3% - Propóleo 1.5%* del Agar FLYM para las cepas de *Escherichia coli* un 90% de agares obtuvieron un calificativo de Bueno y 10% de agares con calificativo de Regular con relación al criterio aislamiento y visualización de la morfología de la colonia bacteriana.

En ambos casos se tuvo como referencia el Agar Nutritivo.

- **Decisión:** Por lo tanto, se acepta la hipótesis alterna (**H₂**).

Hipótesis general:

- **H_G**: El efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellífera* del Agar FLYM en la detección de contaminantes bacterianos es considerado Bueno.
- **H_{G0}**: El efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellífera* del Agar FLYM en la detección de contaminantes bacterianos no es considerado Bueno.
- Mediante el uso del agar *Miel de Abeja 3% - Propóleo 1.5%* del Agar FLYM para las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* un 90% de agares obtuvieron un calificativo de Bueno y 10% de agares con calificativo de Regular con relación al criterio aislamiento y visualización de la morfología de la colonia bacteriana. En ambos casos se tuvo como referencia el Agar Nutritivo.
- **Decisión:** Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y habiéndose aceptado las hipótesis alternas H₁ y H₂, se acepta la hipótesis alterna de la hipótesis general de estudio.

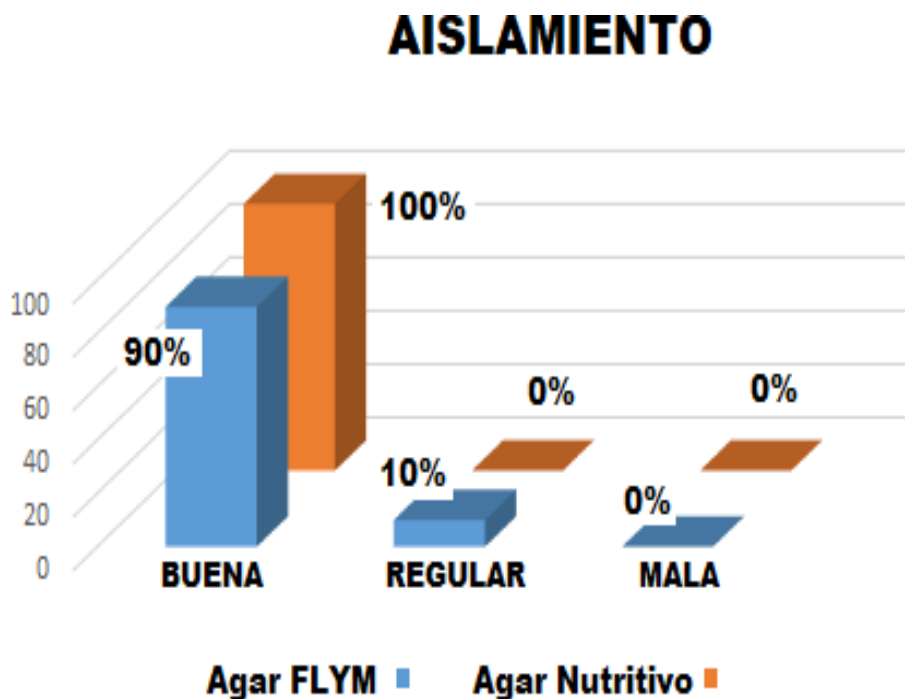


Figura N° 01: Aislamiento

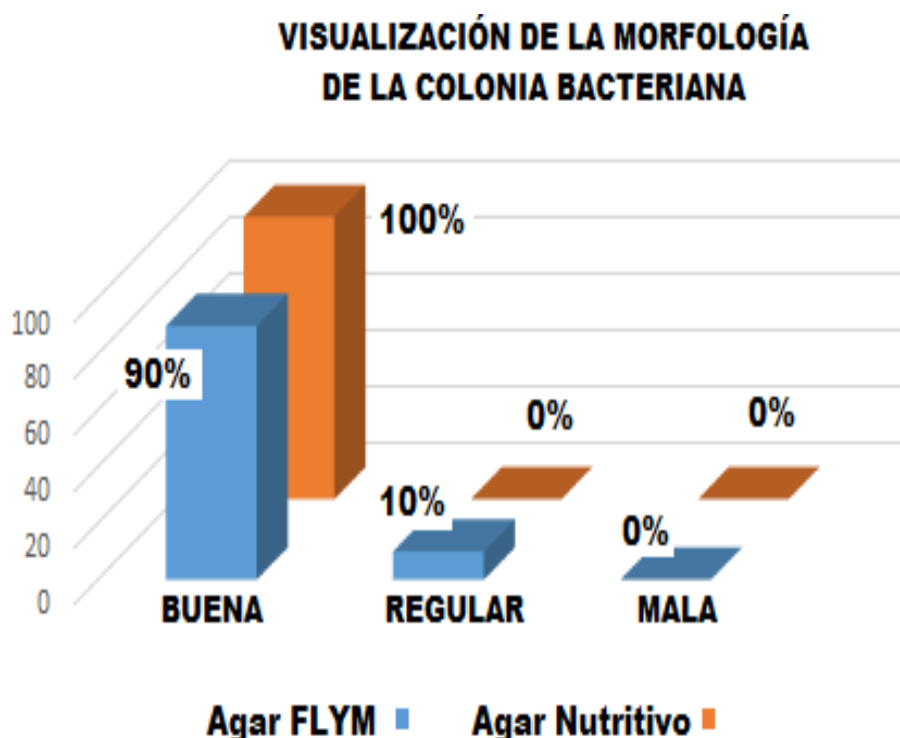


Figura N° 02: Visualización de la morfología de la colonia bacteriana

4.3. Discusión de resultados

En el presente estudio se evaluó, el efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellífera* del Agar FLYM en la detección de contaminantes bacterianos; para ello, se utilizaron las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Para la detección de los metabolitos primarios y secundarios de la Miel de Abeja y Propóleo, se pudo tener acceso a los diferentes solventes que se manejan en los laboratorios de Ciencias Básicas de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica. Para la extracción del Propóleo, se tuvo en cuenta el uso de los Apicultores, en la cual se trabaja con etanol al 96°. En nuestro estudio, al realizar la prueba de solubilidad, se confirmó la amplia solubilidad de nuestras muestras en agua y alcohol de 96°. (Estrada, 2017; Vayas 2017; Bellido, 2018; Rueda, 2015 y Fritz, 2011).^{01, 29, 38, 42, 62.}

Durante la investigación de los compuestos químicos de la miel de abeja y propóleo. Se utilizó una serie de sustancias químicas con la finalidad de detectar la presencia de metabolitos primarios y secundarios. Para la *Miel de Apis mellifera*, se obtuvo en mayor cantidad: alcaloides, triterpenoides, glicósidos y carbohidratos y con respecto al *Propóleo*:

Compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, taninos y glicósidos, los cuales, en conjunto, son los responsables de darles las características a las especies estudiadas; de esta manera, se puede corroborar los resultados reportados por (Campo, M; Solares, 2013; Acquarone, 2004; Fritz, 2011 y Sánchez, 2017).^{45, 47, 58, 62, 69.}

La Miel de Abeja se procesó de forma pura, mientras que el Propóleo fue pesado, lavado, cortado, triturado, secado y posteriormente pasó por molienda; no se trabajó con solventes como cloroformo, éter u otros reactivos químicos, debido a que el uso de otras sustancias químicas de naturaleza orgánica o inorgánica podría interferir en el aislamiento y visualización de la morfología de las colonias bacterianas. (Rey, 2012; Zandamela, 2008; Bellido, 2018; Aquino *et.al*, 2015; Infantes *et.al*, 2015).^{12, 10, 34, 36, 38.}

Se realizó el cultivo para la realización de la siembra y aislamiento de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* ATCC en las placas del Agar FLYM, que ha sido elaborado a base de *Miel de Abeja* 3% y Propóleo al 1.5%, dando como resultado un 90% con el calificativo Bueno y un 10% de Regular, con relación a los criterios aislamiento y visualización de la morfología de la colonia bacteriana; del mismo modo un 100% de calificativo de Bueno para el Agar Nutritivo.

La posible causa de no alcanzar el 100% del calificativo Bueno, se debe a la presencia de los alcaloides, compuestos fenólicos y taninos en las muestras de Propóleo, los cuales presentan actividad antibacteriana, teniendo en cuenta los estudios de Galarza, 2013; Vayas, 2017; Gamboa, 2014 y Takaise-Kikuni *et. al*, 1994; Adrianzén.^{14, 29, 31, 39, 61.}

Se trabajó con la concentración de Miel de Abeja al 3% y Propóleo al 1.5%, debido que a menores concentraciones no se distinguía uniformemente el aislamiento y visualización de la morfología de las colonias bacterianas.

En relación a la visualización de las colonias de *Escherichia coli*, se apreciaba su morfología y en el caso del *Staphylococcus aureus*, las colonias presentaron el color característico, el mismo que variaba de color amarillo al oro; del mismo modo, el color se favorecía por la incubación de los cultivos pasado las 24 horas adicionales. (Koneman, 2006; Vayas, 2017; Ulloa, 2010; Gutiérrez, 2008 y Rueda, 2015) ^{21 29, 32, 33 y 42.}

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones:

1. El efecto de la Miel de Abeja y Propóleo del Agar FLYM en la detección de contaminantes bacterianos es Buena.
2. Las muestras estudiadas presentan metabolitos primarios y secundarios para la Miel de *Apis mellífera*, se obtuvo en mayor cantidad: alcaloides, triterpenoides, glicósidos y carbohidratos y con respecto al Propóleo: compuestos fenólico, flavonoides, alcaloides, taninos y glicósidos,
3. El efecto de la Miel de Abeja y Propóleo del Agar FLYM en la detección de *Staphylococcus aureus* es Buena.
4. El efecto de la Miel de Abeja y Propóleo del Agar FLYM en la detección de *Escherichia coli* es Buena.

5.2. Recomendaciones:

1. Continuar los estudios en estos medios de cultivo utilizando cepas aerobias y anaerobias estrictas.
2. Trabajar con concentraciones de Miel de Abeja y Propóleo mayores al 3%.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Estrada J. Procesamiento y Vida en Anaquel de Miel de Abejas Peruanas [Tesis para optar el Título de Ingeniero de Industrias Alimentarias]. Lima: Universidad Nacional Agraria la Molina; 2017.
2. Bautista R. Efecto Antibacteriano de la Miel de Abeja en diferentes concentraciones sobre el *Streptococo mutans* [Tesis para optar el Título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad San Martín de Porres; 2011.
3. Calderón A. Actividad antibacteriana in vitro de soluciones de Propóleo etanólico sobre dos bacterias periodonto patógenas frecuentes en la enfermedad gingivo periodontal. Hospital Militar [Tesis para optar el Título de Cirujano Dentista]. Puno: Universidad Nacional del Altiplano; 2010.
4. Jara R. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de cinco propóleos peruanos sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguis* (ATCC 10556) [Tesis para optar el Título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas; 2014.
5. Vélez L, Zambrano J. Efecto inhibitorio in vitro de la miel de abeja sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* aisladas de heridas superficiales [Tesis para optar el Título de Licenciado en Biología]. Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2018.
6. Castro E. Efecto antibacteriano de miel de *Apis mellífera* y algarrobina de *Prosopis pallida* sobre coliformes en quesillos preparados artesanalmente expendidos en el mercado “La Unión” - Trujillo. [Tesis para optar el Título de Licenciado en Nutrición]. Trujillo: Universidad César Vallejo; 2017.
7. Álvarez M. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Própolis de *Apis mellífera* (Propóleo) frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. [Tesis para optar el Grado de Maestro en Estomatología]. Trujillo: Universidad Privada Antenor Orrego; 2014.
8. Kuklinski C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1 ed. Barcelona: Omega S.A; 2000.
9. Arévalo C. Efecto antimicrobiano in vitro de tres variedades de Própolis frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 [Tesis para optar el Título de Cirujano Dentista]. Trujillo: Universidad Privada Antenor Orrego; 2014.

10. Aquino W, Arroyo N. Efecto bactericida del extracto hidroalcohólico de Propóleos en bacterias gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y gram negativa (*Salmonella typhi*) a diferentes concentraciones [Tesis para optar el Título de Ingeniero Agro industrial]. Tarma: Universidad Nacional del Centro del Perú; 2015.
11. Becerra D, Cabrera J, Solano M. Efecto antibacteriano de la Miel de Abeja en diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus*. Rev. Cient. Cienc. Med. 2016 Dic; 19(2): 38 – 42.
12. Infantes R, Millones P. Efectividad antimicrobiana del Propóleos frente a bacterias periodonto patógenas. Rev. In. Cre. 2015 Nov; 2 (2): 567 – 573.
13. Talero C. Actividad anti-gérmes in vitro de extractos etanólico de Propóleos obtenido de abejas (*Apis mellífera*) en tres áreas geográficas de Colombia [Tesis para optar el Título de Magister en Producción Animal]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2014.
14. Galarza L. Determinación del poder antibiótico in vitro del extracto etanólico del Propóleo sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* presentes en metritis puerperal bovina [Tesis para optar el Título de Magister en Reproducción Animal]. Cuenca: Universidad De Cuenca; 2013.
15. Reyes C. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica. [Tesis para optar el Título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010.
16. Ganosa M. Fundamentación Química de las Reacciones de coloración y Precipitación en la identificación de Metabolitos Secundarios de Plantas Medicinales [Tesis Titulación]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2000.
17. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. 1 ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988.
18. Tortora F. Introducción a la Microbiología. 9 ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2007.
19. Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S, Mietzner T. Microbiología Médica. 25 ed. México: Manual moderno; 2010.
20. Wiley J, Sherwood L, Woolverton C. Microbiología de Prescott, Harley y Klein. 7 ed. Madrid: McGraw-Hill; 2008.

21. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas color. 6 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006.
22. Ryan K, Ray C. Sherris Microbiología Médica. 5 ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2011.
23. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3 ed. Madrid: Médica Panamericana; 2003.
24. Murray R, Patrick S. Microbiología Médica. 6 ed. Barcelona: Elsevier; 2006.
25. De la Rosa M, Prieto J, Navarro J. Microbiología en Ciencias de la Salud. 3 ed. Barcelona: Elsevier; 2011.
26. Hernández R, Fernández C, Baptista L. Metodología de la Investigación. 5 ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2010.
27. San José – Rodríguez J. La miel como antibiótico tópico en las úlceras por presión. Rev. Med. Nat. 2015 May; 9 (2): 93 – 102.
28. Vega–Oliveros C, Gutiérrez-Cortés C, Díaz-Moreno C. Actividad Antimicrobiana de Mieles de *Apis mellífera* de la Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. Rev. Fac. Nal. Agr. 2014 Jul; 67(2): 743 - 745
29. Vayas B. Evaluación de métodos de sensibilidad en la efectividad antimicrobiana de la miel de abeja sobre cepa certificada de (*Staphylococcus aureus*) [Tesis para optar el Título de Médico Veterinario Zootecnista]. Cevallos: Universidad Técnica de Ambato; 2017.
30. Cabrera L, Ojeda G, Céspedes E, Colina A. Actividad antibacteriana de miel de abejas multiflorales (*Apis mellífera scutellata*) de cuatro zonas apícolas del estado Zulia, Venezuela. Rev. Cient. 2003 Mar; 13(3): 205-211.
31. Gamboa M. Estudio e identificación de características de composición y bioactividad propias de miel de mielato de *Apis mellífera* [Tesis para optar el Grado de Maestro en Ciencias]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2014.
32. Ulloa J, Mondragón P, Rodríguez R, Reséndiz J, Rosas P. La Miel de Abeja y su Importancia. Rev. Fuent. 2010 Sep; 2(4): 11 – 18.
33. Gutierrez M, Rodríguez A. Miel de Abejas Una Fuente de Antioxidantes. FuFarm. 2008 Enero; 1 (12): 39-44.

34. Rey J. Composición Química de la Miel de Abeja (*Apis mellifera*) producida en las localidades del Río Ichu de Huancavelica [Tesis para optar el Título de Ingeniero Zootecnista]. Huancavelica: Universidad Nacional de Huancavelica; 2012.
35. Borges M, Vásquez J, Rodríguez A. Preparación de Agar a partir de mosto de destilería y harina de soya para detectar contaminantes microbianos en cultivo de tejidos vegetales. Rev. Bioagro 2003 Jul; 15(3): 217 – 220.
36. Zandamela E. Caracterización físico-química y evaluación sanitaria de la miel de Mozambique [Tesis para optar el Grado Académico de Doctor en Veterinaria]. Bellatera: Universidad Nacional Autónoma de Barcelona; 2008.
37. Cruzado L, Gutierrez D, Ruiz S. Ensayo químico y efecto de antibiosis in vitro de la miel de abeja sobre microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Rev. Med. Vallejana 2007 Set; 4(2): 95 – 107.
38. Bellido M. Efecto Antibacteriano In vitro de la Miel de Abeja “*Apis mellifera*” del Centro Apicultor “Rinconada Alta” del Distrito de Lurín frente a la cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 [Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2018.
39. Takaisi - Kikuni N, Schilcher H. Electrón Microscopic and Micro Calorimetric Investigations of the Possible Mechanism of the Antibacterial Action of a defined Própolis Provenance. Rev. Planta Med. 1994 Jun; 6 (3): 222-227.
40. Martos A, Oré J. Compuestos Químicos en la Miel y el Polen. BAP-UNAM. 2016 Mar; 1 (4): 2-7.
41. Martos A. Productos de la Colmena. BAP-UNAM. 2015 Jun; 1 (1): 1-7.
42. Rueda M. Estudio comparativo in vitro del efecto antibacteriano del extracto de Propóleo Ecuatoriano vs Gluconato de clorhexidina contra *Streptococcus mutans* [Tesis para optar el Título de Cirujano Dentista]. Quito: Universidad Central del Ecuador; 2015.
43. Mayta - Tovalino F, Sacsquispe – Contreras S. (2009). Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de Propóleo de Oxapampa – Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Rev. Estomatol. Herediana. 2010 Abr; 20 (1): 19 - 24.
44. Saiz M, Serrano J. Propóleo: Aplicaciones Terapéuticas. Rev. Natura Medicatrix. 2003 Mar; 21 (2): 94 – 104.

45. Campo M. E Estudio Químico de Propóleos Rojos Cubanos [Tesis para optar el Grado de Doctor en Ciencias Farmacéuticas]. Habana: Universidad de la Habana; 2007.
46. Gallez L, Fernández L, Cibanal L. Propóleos su uso como Biofungicida Agrícola. Rev Ciencia Hoy. 2017 May; 26 (155): 55 – 59.
47. Acquarone C. Parámetros fisicoquímicos de mieles, relación entre los mismos y su aplicación potencial para la determinación del origen botánico y/o geográfico de mieles argentinas [Tesis para optar el Título de Licenciado en Tecnología de Alimentos]. Buenos Aires: Universidad de Belgrano; 2004.
48. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO. La Apicultura y los Medios de Vida Sostenibles: resumen de orientación. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/008/y5110s/y5110s00.htm#Contents> (revisado el 03 de julio 2018).
49. Suescún L, Vit P. Control de Calidad de la miel de abejas producida como propuesta para un proyecto de servicio comunitario obligatorio. FuFarm. 2008 Enero; 1 (12): 6-15.
50. Ávila H. Introducción a la Metodología de la Investigación. 1 ed. Chihuahua: Cuauhtémoc; 2006.
51. Rojas D. Estandarización de un Medio de Cultivo Complejo para la Multiplicación de la Cepa C50 de Rhizobium spp [Tesis para optar el Título profesional de Microbiólogo Industrial]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
52. Granados R, Villaverde C. Microbiología tomo I. 1 ed. Madrid: Cengage; 2003.
53. Pratt C, Cornely K. Bioquímica. 2 ed. México: El Manual Moderno; 2012.
54. Nelson D, Cox M. Lehninger Principios de Bioquímica. 5 ed. Barcelona: Omega S.A; 2009.
55. Lopardo H. Introducción a la Microbiología Clínica. 1 ed. Buenos Aires: Universidad de la Plata; 2016.
56. Salvador B, Vega L. Manual de Prácticas de Laboratorio de Bacteriología y Micología. 1 ed. Toluca: Universidad Autónoma del Estado de México; 2013.
57. Parés R, Juárez A. Bioquímica de los Microorganismos. 1 ed. Barcelona: Reverté S.A; 2012.

58. Solares C. Estudio Comparativo de los niveles de Sacarosa y Azúcares Reductores (Glucosa + Fructosa) de la Miel de Abeja (*Apis mellífera*) [Tesis para optar el Título de Zootecnista]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2013.
59. Reynoso M, Magnoli C, Barros G, Demo M. Manual de Microbiología General. 1 ed. Argentina: UniRío; 2015.
60. Dominguez M. Métodos analíticos para el control de calidad de productos Apícolas [Tesis para optar el Grado de Doctora en Química]. Bahía Blanca: Universidad Nacional del Sur; 2014.
61. Adrianzén J, García V. Efecto in Vitro de la Miel de *Apis mellífera* frente a *Escherichia coli* y *Cándida albicans* [Tesis para optar el Grado de Bachiller en Farmacia y Bioquímica]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2017.
62. Fritz J. Caracterización Química del Propóleo Chileno [Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico]. Valdivia: Universidad Austral de Chile; 2011.
63. Lituma J, Melgarejo L. Preparación del Agar Litme a partir de *Lepidium meyenii* W. (Maca) y *Prosopis pallida* (Algarrobo) para detectar contaminantes Bacterianos [Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2018.
64. Pérez B, Isabel de Silóniz M, Torralba B, Vásquez C. Metodología de esterilización en el laboratorio microbiológico. Reduca (Biología) Ser. Microb. 2010 Mar; 3(5): 1 – 14.
65. Agar Nutritivo [Internet]. Argentina: Britania Lab; 2015 [citado el 25 septiembre 2018]. Disponible en: http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a28446b169d.pdf.
66. Sacaquispe R, Ventura G. Manual de Procedimientos Bacteriológicos en Infecciones Intrahospitalarias. 1ed. Lima: INS; 2001.
67. Cultimed-Manual Básico de Microbiología [Internet]. España: Asenlab; c2009 [citado el 25 septiembre 2018]. Disponible en: <http://www.asenlab.com/downloads/microbiologia.pdf>
68. Merckmillipore [Internet]. Alemania: Merck KGaA; c2009 [citado el 25 septiembre 2018]. Disponible en: <http://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck.pdf>

69. Sánchez K, Composición Química y Potencial Biológico de una Muestra de Propóleos Ecuatoriano [Tesis para optar el Título de Bioquímica Farmacéutica]. Machala: Universidad Técnica de Machala; 2017.

ANEXOS

ANEXO N° 01: MATRIZ DE CONSISTENCIA

Preparación de Agar FLYM a partir de Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellifera* para Detectar Contaminantes Bacterianos

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVOS GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES			METODOLOGÍA	
			V1.	DIMENSION	INDICADORES		
¿Cuál será el efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de <i>Apis mellifera</i> del Agar FLYM en la detección de contaminantes bacterianos?	Determinar el efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de <i>Apis mellifera</i> del Agar FLYM en la detección de contaminantes bacterianos.	El efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de <i>Apis mellifera</i> del Agar FLYM en la detección de contaminantes bacterianos es Buena.	Efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de <i>Apis mellifera</i> del Agar FLYM	Fitoquímica	Solubilidad		<ul style="list-style-type: none"> - Enfoque: Cuantitativo. - Tipo: Aplicado. - Nivel: Transversal. - Diseño: Experimental. - Población: 20. - Muestra: 5. - Técnica: <ul style="list-style-type: none"> Técnica de Preparación de Medio de Cultivo. Técnica de Siembra y Aislamiento. - Instrumento: <ul style="list-style-type: none"> Tabla de Estudio Fitoquímico. Tabla de Solubilidad. Tabla de Evaluación de Medios de Cultivo.
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS			V2.	DIMENSION	
¿Cuál será la composición química de la Miel de Abeja y Propóleo de <i>Apis mellifera</i> ?	Determinar la composición química de la Miel de Abeja y Propóleo de <i>Apis mellifera</i> .	Miel de Abeja y Propóleo de <i>Apis mellifera</i> tienen metabolitos primarios y secundarios.	Detección de contaminantes bacterianos	Aislamiento.	BUENA	80 – 100%	
¿Cuál será el efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de <i>Apis mellifera</i> del Agar FLYM en la detección de <i>Staphylococcus aureus</i> ?	Evaluar el efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de <i>Apis mellifera</i> del Agar FLYM en la detección de <i>Staphylococcus aureus</i> .	El efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de <i>Apis mellifera</i> del Agar FLYM en la detección de <i>Staphylococcus aureus</i> es Buena.			REGULAR	60 – 79%	
¿Cuál será el efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de <i>Apis mellifera</i> del Agar FLYM en la detección de <i>Escherichia coli</i> ?	Evaluar el efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de <i>Apis mellifera</i> del Agar FLYM en la detección de <i>Escherichia coli</i> .	El efecto de la Miel de Abeja y Propóleo de <i>Apis mellifera</i> del Agar FLYM en la detección de <i>Escherichia coli</i> es Buena.			Visualización de la Morfología de la Colonia.	BUENA	
			REGULAR	60 – 79%			
			MALA	50 – 59%			

ANEXO N° 02: TESTIMONIO FOTOGRÁFICO

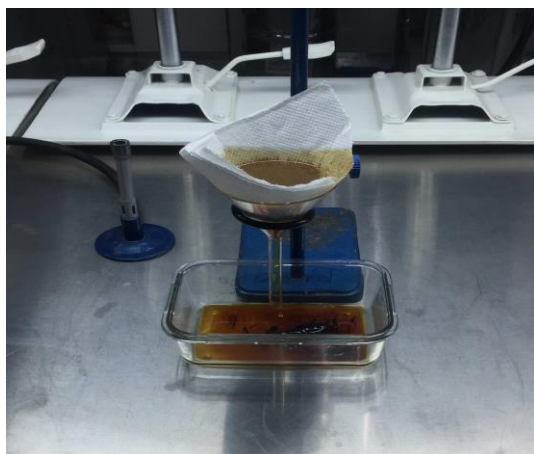
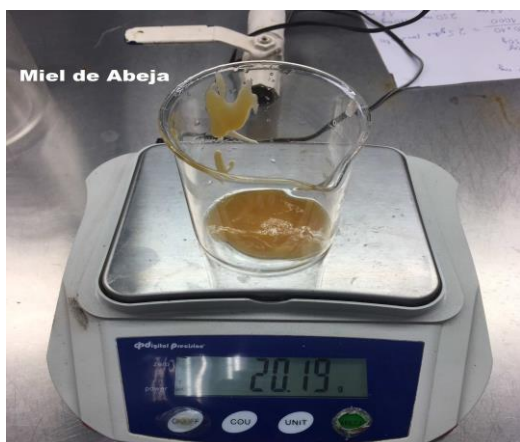
a) Recolección de Miel de *Apis mellifera*.



b) Recolección de Propóleo de *Apis mellifera*.



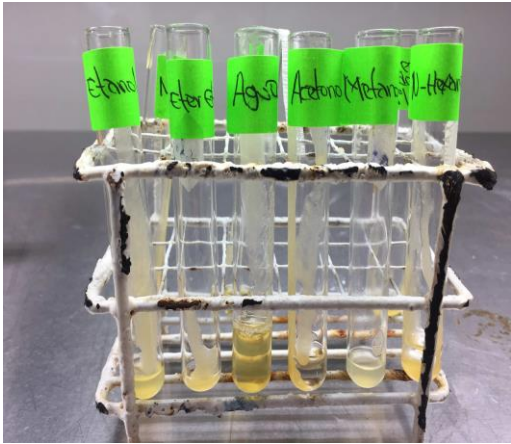
c) Procesamiento de la Miel y Propóleo de Apis mellífera.



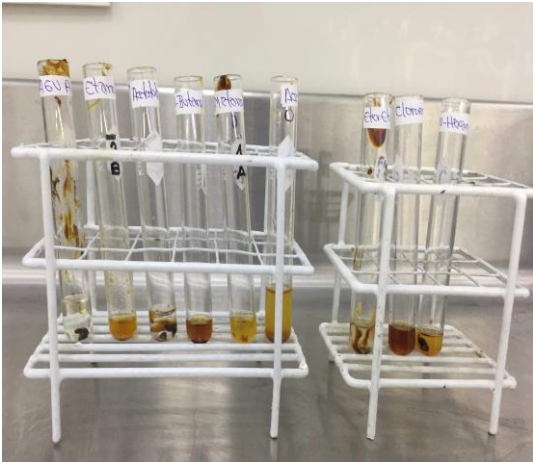
d) Reactivos Químicos para la Prueba de Solubilidad y Tamizaje Fitoquímico.



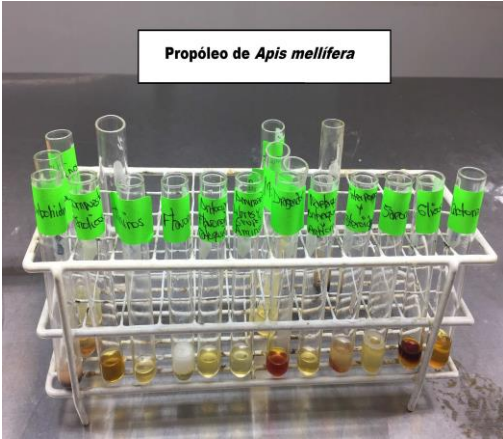
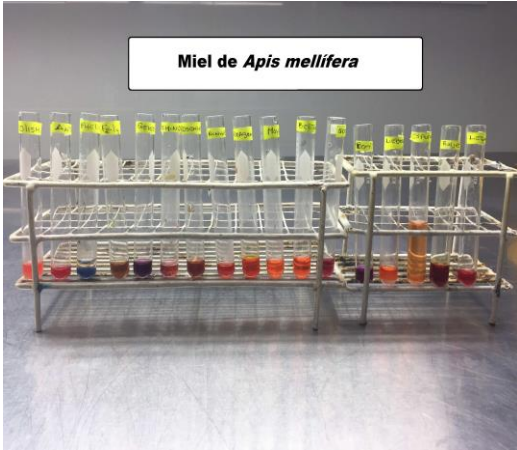
e) Resultados del Tamizaje y de la Solubilidad.



Miel de Abeja



Propóleo de Abeja



f) Acondicionamiento y Preparación de Materiales.

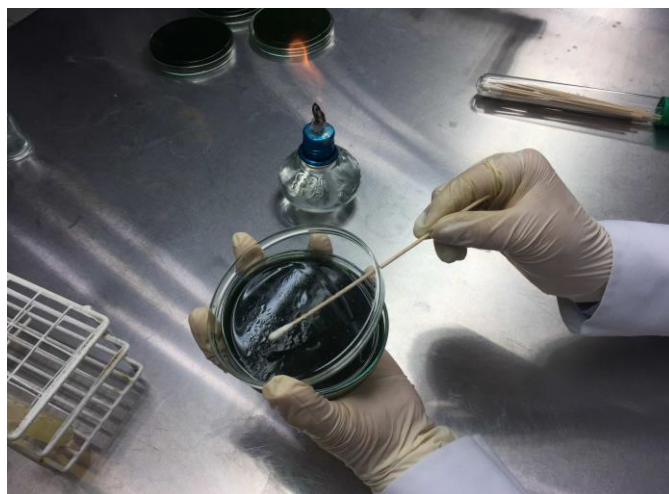


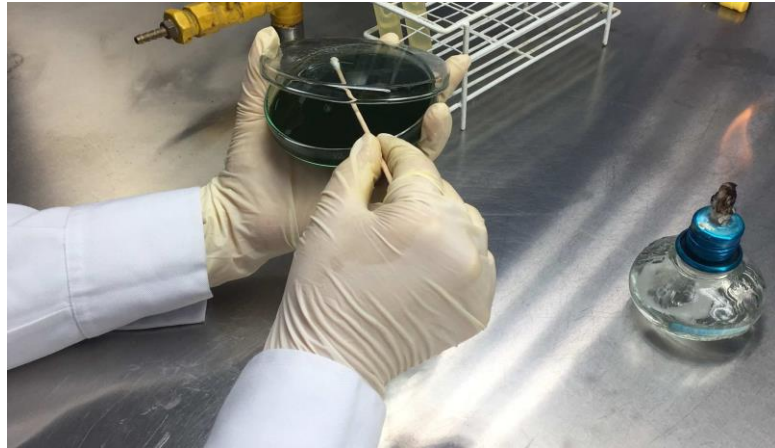
g) Formulación y Preparación de Medios de Cultivo.



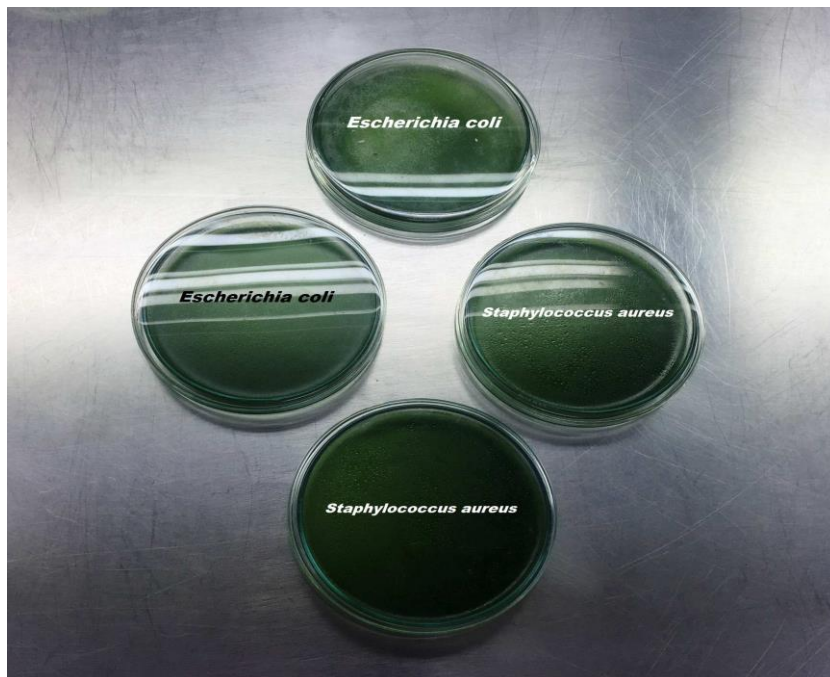


h) Siembra de Cepas Bacterianas.





i) Lectura de Medios de Cultivo: Agar FLYM.





j) Siembra y Aislamiento de las cepas en Agar Nutritivo.



Escherichia coli



Staphylococcus aureus

ANEXO N° 03: CERTIFICADO CEPAS ATCC



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0360 Lot Number: 360-290 Reference Number: ATCC® 25923™* Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2018/8/31 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2016/9/14
---	---

Performance	
Macroscopic Features: Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, smooth, opaque, beta hemolytic Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 27 - 35 mm (1) Penicillin (10 units - Disk Susceptibility): 26 - 37 mm (1) Oxacillin (1 mcg - Disk Susceptibility): 18 - 24 mm <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE </div>

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.


(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.





Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Escherichia coli Catalog Number: 0335 Lot Number: 335-211 Reference Number: ATCC® 8739™* Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2018/8/31 Release Information: Quality Control Technologist: Tracy A Blenker Release Date: 2016/10/13
---	---

Performance	
Macroscopic Features: 2 colony types, both are gray & beta hemolytic; one is circular to irregular, convex, slightly erose edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, erose edge & rough	Medium: SBAP
Microscopic Features: Gram negative straight rod	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 16 - 22 mm (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm (1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm
	 Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.



(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

TESTING CERT #2655.01

ANEXO N° 04: CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE PACIENTES

LABORATORIO BIOLÓGICO Y ANÁLISIS CLÍNICO SANTA ROSA DE
PACHACAMAC E.I.R.L.

CONSTANCIA

Por medio de la presente hago constar que durante los meses de Octubre, Noviembre, Diciembre 2017 y Enero del 2018, se han aislado de las diversas muestras clínicas patológicas de rutina, analizadas en el Área de Microbiología del Laboratorio Biológico y Análisis Clínico Santa Rosa de Pachacamac E.I.R.L. los siguientes microorganismos:

- a) Escherichia coli: 05. Correspondientes a Urocultivo.
- b) Estafilococo aureus: 05. Correspondientes a Secreción Faringea.
- c) Salmonella typhi: 02. Correspondientes a Coprocultivo.

Asimismo, se hace entrega de las diversas muestras aisladas al T.M. Walter Siri Rodríguez, miembro del Equipo de Docentes Investigadores de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega para realizar Proyectos de Investigación y para los fines pertinentes.

Pachacamac. 12 de Febrero de 2018.


JACINTA A. ARIAS REYES
BIOLOGA-C.B.P. 3964
-SP. MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA-

ANEXO N° 05: VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO



Universidad
Inca Garcilaso de la Vega
Nuevos Tiempos. Nuevas Ideas

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

HOJA DE VALIDACIÓN DE LOS INSTRUMENTOS

FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Preparación de Agar FLYM a partir de Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellifera* para Detectar Contaminantes Bacterianos

Después de revisado el Instrumento es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

	50	60	70	80	90	100
1. ¿En qué porcentaje estima que con estos instrumentos se lograrán los objetivos propuestos?	()	()	()	()	()	(x)
2. ¿En qué porcentaje considera que las tablas están referidos a los conceptos del tema?	()	()	()	()	(x)	()
3. ¿En qué porcentaje cree que las tablas planteadas son suficientes para lograr los objetivos?	()	()	()	()	()	(x)
4. ¿En qué porcentaje estima que las tablas del instrumento son de ejecución viable?	()	()	()	()	(x)	()
5. ¿Qué porcentaje considera que las tablas siguen una secuencia lógica?	()	()	()	()	()	(x)
6. ¿En qué porcentaje cree usted que con los instrumentos, se obtendrán datos similares si se replicará con otras muestras?	()	()	()	()	()	(x)

SUGERENCIAS

- ¿Qué Items considera usted que deben agregarse?
NINGUNO
- ¿Qué Items considera usted que deben eliminarse?
NINGUNO
- ¿Qué Items considera usted que deben reformularse o precisarse mejor?
NINGUNO

FECHA: 28-11-2018

VALIDADO POR:

Mg. Tinsón Tereza Neuman MARIO
Codigo J3917



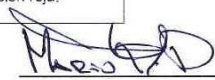
Preparación de Agar FLYM a partir de Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellifera* para Detectar Contaminantes Bacterianos

PRUEBA DE SOLUBILIDAD			
N°	SOLVENTES	NOMENCLATURA	RESULTADO
1.	Agua destilada	H ₂ O	
2.	Etanol	Et(OH)	
3.	Metanol	MeOH	
4.	n - butanol	n.buOH	
5.	Acetato de etilo	EtoAc	
6.	Cloroformo	CHCl ₃	
7.	Hexano	Hex	
8.	Acetona	Me ₂ CO	
9.	Éter etílico	Et ₂ O	
10.	Éter de petróleo	EP	

LEYENDA:

- La Solubilidad no se visualiza. (-)
- La Solubilidad en menor grado. (+)
- La Solubilidad es moderada. (++)
- La Solubilidad es mayor. (+++)

MARCHA FITOQUÍMICA			
N°	METABOLITO	REACTIVO DE IDENTIFICACIÓN	REACCIÓN POSITIVA
1	Carbohidratos	Molish.	Anillo violeta.
		Antrona.	Coloración verde.
		Fehling.	Precipitado rojo ladrillo.
2	Compuestos Fenólicos	FeCl ₃	Coloración verde o azul.
3	Taninos	Gelatina.	Precipitado denso blanco.
4	Flavonoides	Shinoda.	Chalconas, auronas, isoflavanonas: No hay coloración.
			Isoflavonas: Amarillo rojizo.
			Flavanonoles: Rojo a magenta.
			Flavonas y flavonoles: Amarillo a rojo.
5	Antocianinas y Flavonoides Catéquicos	Rosenheim.	Coloración rojo oscuro.
6	Aminoácidos Libres y Grupos Amino	Ninhidrina.	Coloración violácea.
7	Alcaloides	Dragendorff.	Precipitado naranja.
		Mayer.	Precipitado blanco.
		Bertrand.	Precipitado blanco.
		Sonnenschein.	Precipitado amarillo-verdoso.
8	Naftaquinonas, Antraquinonas y Antranonas	Borntrager.	Coloración roja.


Mg. Tiviana Pérez-Núñez
Código J. 397




MARCHA FITOQUÍMICA (Continuación)			
N°	METABOLITO	REACTIVO DE IDENTIFICACIÓN	REACCIÓN POSITIVA
9	Triterpenoides y Esteroides	Lieberman-Burchard.	Esteroides: verde-azul. Triterpenoides: rojo-naranja.
10	Saponinas	Espuma.	0.5 a 1 cm estable por 15 min.
11	Glicósidos	Baljet.	Coloración anaranjada.
12	Lactonas	Legal.	Coloración rojo oscuro.
13	Cumarinas	NaOH 10%.	Fluorescencia celeste.
14	Ácido Carminico	BaCl ₂ 2%.	Violeta Mate

LEYENDA:

- No realizada (0)
- Ausente (-)
- Leve (+)
- Moderado (++)
- Abundante (+++)

ESTUDIO DE LOS AGARES					
AISLAMIENTO		AGAR		AGAR NUTRITIVO	
		Miel de Abeja 5% - Propóleo 5%			
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 - 100%				
REGULAR	60 - 79%				
MALA	50 - 59%				
TOTAL					
VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LA COLONIA BACTERIANA		AGAR		AGAR NUTRITIVO	
		Miel de Abeja 5% - Propóleo 5%			
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 - 100%				
REGULAR	60 - 79%				
MALA	50 - 59%				
TOTAL					


Mg. TINEBA TERESA ROSA MORA
codigo J 397



HOJA DE VALIDACIÓN DE LOS INSTRUMENTOS

FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Preparación de Agar FLYM a partir de Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellifera* para Detectar Contaminantes Bacterianos

Después de revisado el Instrumento es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

- | | MENOS DE: |
|---|-------------------------|
| | 50 60 70 80 90 100 |
| 1. ¿En qué porcentaje estima que con estos instrumentos se lograrán los objetivos propuestos? | () () () () () (x) |
| 2. ¿En qué porcentaje considera que las tablas están referidos a los conceptos del tema? | () () () () (x) () |
| 3. ¿En qué porcentaje cree que las tablas planteadas son suficientes para lograr los objetivos? | () () () () () (x) |
| 4. ¿En qué porcentaje estima que las tablas del instrumento son de ejecución viable? | () () () () (x) () |
| 5. ¿Qué porcentaje considera que las tablas siguen una secuencia lógica? | () () () () () (x) |
| 6. ¿En qué porcentaje cree usted que con los instrumentos, se obtendrán datos similares si se replicará con otras muestras? | () () () () () (x) |

SUGERENCIAS

- ¿Qué Items considera usted que deben agregarse?
NINGUNO
- ¿Qué Items considera usted que deben eliminarse?
NINGUNO
- ¿Qué Items considera usted que deben reformularse o precisarse mejor?
NINGUNO

FECHA: 28-11-2018

VALIDADO POR:

Mg ARANGUREN BELAUNDE, LUIS ANTONIO
CÓDIGO

D778



Preparación de Agar FLYM a partir de Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellifera* para Detectar Contaminantes Bacterianos

PRUEBA DE SOLUBILIDAD			
N°	SOLVENTES	NOMENCLATURA	RESULTADO
1.	Agua destilada	H ₂ O	
2.	Etanol	Et(OH)	
3.	Metanol	MeOH	
4.	n - butanol	n.buOH	
5.	Acetato de etilo	EtOAc	
6.	Cloroformo	CHCl ₃	
7.	Hexano	Hex	
8.	Acetona	Me ₂ CO	
9.	Éter etílico	Et ₂ O	
10.	Éter de petróleo	EP	

LEYENDA:

- La Solubilidad no se visualiza. (-)
- La Solubilidad en menor grado. (+)
- La Solubilidad es moderada. (++)
- La Solubilidad es mayor. (+++)

MARCHA FITOQUÍMICA			
N°	METABOLITO	REACTIVO DE IDENTIFICACIÓN	REACCIÓN POSITIVA
1	Carbohidratos	Molish.	Anillo violeta.
		Antrona.	Coloración verde.
		Fehling.	Precipitado rojo ladrillo.
2	Compuestos Fenólicos	FeCl ₃ .	Coloración verde o azul.
3	Taninos	Gelatina.	Precipitado denso blanco.
4	Flavonoides	Shinoda.	Chalconas, auronas, isoflavanonas: No hay coloración.
			Isoflavonas: Amarillo rojizo.
			Flavanonoles: Rojo a magenta.
			Flavonas y flavonoles: Amarillo a rojo.
5	Antocianinas y Flavonoides Catéquicos	Rosenheim.	Coloración rojo oscuro.
6	Aminoácidos Libres y Grupos Amino	Ninhidrina.	Coloración violácea.
7	Alcaloides	Dragendorff.	Precipitado naranja.
		Mayer.	Precipitado blanco.
		Bertrand.	Precipitado blanco.
		Sonnenschein.	Precipitado amarillo-verdoso.
8	Naftaquinonas, Antraquinonas y Antranonas	Borntrager.	Coloración roja.

Mg. ARANGUREN BELAUNDE LUIS Antonio

D778



MARCHA FITOQUÍMICA (Continuación)			
N°	METABOLITO	REACTIVO DE IDENTIFICACIÓN	REACCIÓN POSITIVA
9	Triterpenoides y Esteroides	Lieberman-Burchard.	Esteroides: verde-azul. Triterpenoides: rojo-naranja.
10	Saponinas	Espuma.	0.5 a 1 cm estable por 15 min.
11	Glicósidos	Baljet.	Coloración anaranjada.
12	Lactonas	Legal.	Coloración rojo oscuro.
13	Cumarinas	NaOH 10%.	Fluorescencia celeste.
14	Ácido Carminico	BaCl ₂ 2%.	Violeta Mate
LEYENDA:			
<ul style="list-style-type: none"> - No realizada (0) - Ausente (-) - Leve (+) - Moderado (++) - Abundante (+++) 			

ESTUDIO DE LOS AGARES					
AISLAMIENTO		AGAR		AGAR NUTRITIVO	
		Miel de Abeja 5% - Propóleo 5%			
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%				
REGULAR	60 – 79%				
MALA	50 – 59%				
TOTAL					
VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LA COLONIA BACTERIANA		AGAR		AGAR NUTRITIVO	
		Miel de Abeja 5% - Propóleo 5%			
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 – 100%				
REGULAR	60 – 79%				
MALA	50 – 59%				
TOTAL					

Mg. ARANGUREN BELAUNDE, Luis Antonio


 D778



HOJA DE VALIDACIÓN DE LOS INSTRUMENTOS

FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Preparación de Agar FLYM a partir de Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellifera* para Detectar Contaminantes Bacterianos

Después de revisado el Instrumento es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

- | | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1. ¿En qué porcentaje estima que con estos instrumentos se lograrán los objetivos propuestos? | () | () | () | () | () | (x) |
| 2. ¿En qué porcentaje considera que las tablas están referidos a los conceptos del tema? | () | () | () | () | (x) | () |
| 3. ¿En qué porcentaje cree que las tablas planteadas son suficientes para lograr los objetivos? | () | () | () | () | () | (x) |
| 4. ¿En qué porcentaje estima que las tablas del instrumento son de ejecución viable? | () | () | () | () | (x) | () |
| 5. ¿Qué porcentaje considera que las tablas siguen una secuencia lógica? | () | () | () | () | () | (x) |
| 6. ¿En qué porcentaje cree usted que con los instrumentos, se obtendrán datos similares si se replicará con otras muestras? | () | () | () | () | () | (x) |

SUGERENCIAS

- ¿Qué Items considera usted que deben agregarse?
NINGUNO
- ¿Qué Items considera usted que deben eliminarse?
NINGUNO
- ¿Qué Items considera usted que deben reformularse o precisarse mejor?
NINGUNO

FECHA: __28-11-2018__

VALIDADO POR:

Mg. Flores López, Oscar
codigo 5394



Universidad
Inca Garcilaso de la Vega

Nuevos Tiempos. Nuevas Ideas

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

Preparación de Agar FLYM a partir de Miel de Abeja y Propóleo de *Apis mellifera* para Detectar Contaminantes Bacterianos

PRUEBA DE SOLUBILIDAD			
N°	SOLVENTES	NOMENCLATURA	RESULTADO
1.	Agua destilada	H ₂ O	
2.	Etanol	Et(OH)	
3.	Metanol	MeOH	
4.	n - butanol	n.buOH	
5.	Acetato de etilo	EtoAc	
6.	Cloroformo	CHCL ₃	
7.	Hexano	Hex	
8.	Acetona	Me ₂ CO	
9.	Éter etílico	Et ₂ O	
10.	Éter de petróleo	EP	

LEYENDA:

- La Solubilidad no se visualiza. (-)
- La Solubilidad en menor grado. (+)
- La Solubilidad es moderada. (++)
- La Solubilidad es mayor. (+++)

MARCHA FITOQUÍMICA			
N°	METABOLITO	REACTIVO DE IDENTIFICACIÓN	REACCIÓN POSITIVA
1	Carbohidratos	Molish.	Anillo violeta.
		Antrona.	Coloración verde.
		Fehling.	Precipitado rojo ladrillo.
2	Compuestos Fenólicos	FeCl ₃	Coloración verde o azul.
3	Taninos	Gelatina.	Precipitado denso blanco.
4	Flavonoides	Shinoda.	Chalconas, auronas, isoflavanonas: No hay coloración.
			Isoflavonas: Amarillo rojizo.
			Flavanonoles: Rojo a magenta.
Flavonas y flavonoles: Amarillo a rojo.			
5	Antocianinas y Flavonoides Catéquicos	Rosenheim.	Coloración rojo oscuro.
6	Aminoácidos Libres y Grupos Amino	Ninhidrina.	Coloración violácea.
7	Alcaloides	Dragendorff.	Precipitado naranja.
		Mayer.	Precipitado blanco.
		Bertrand.	Precipitado blanco.
		Sonnenschein.	Precipitado amarillo-verdoso.
8	Naftaquinonas, Antraquinonas y Antranonas	Borntrager.	Coloración roja.

Mg. Flores López, Oscar

5394




MARCHA FITOQUÍMICA (Continuación)			
N°	METABOLITO	REACTIVO DE IDENTIFICACIÓN	REACCIÓN POSITIVA
9	Triterpenoides y Esteroides	Lieberman-Burchard.	Esteroides: verde-azul. Triterpenoides: rojo-naranja.
10	Saponinas	Espuma.	0.5 a 1 cm estable por 15 min.
11	Glicósidos	Bajjet.	Coloración anaranjada.
12	Lactonas	Legal.	Coloración rojo oscuro.
13	Cumarinas	NaOH 10%.	Fluorescencia celeste.
14	Ácido Carminico	BaCl ₂ 2%.	Violeta Mate

LEYENDA:

- No realizada (0)
- Ausente (-)
- Leve (+)
- Moderado (++)
- Abundante (+++)

ESTUDIO DE LOS AGARES					
AISLAMIENTO		AGAR		AGAR NUTRITIVO	
		Miel de Abeja 5% - Propóleo 5%			
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 - 100%				
REGULAR	60 - 79%				
MALA	50 - 59%				
TOTAL					
VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LA COLONIA BACTERIANA		AGAR		AGAR NUTRITIVO	
		Miel de Abeja 5% - Propóleo 5%			
		N° AGARES	RESULTADO (%)	N° AGARES	RESULTADO (%)
BUENA	80 - 100%				
REGULAR	60 - 79%				
MALA	50 - 59%				
TOTAL					

Mg. Floris López, 
5394.

ANEXO N° 06: ESTERILIZACIÓN y PREPARACIÓN de MEDIOS de CULTIVO ^(59, 65)

(Reynoso *et al*, 2015; Britania Lab, 2018)

Consideraciones generales:

- Leer atentamente la fórmula de los medios y calcular la cantidad de cada uno de los componentes químicos.
- Pesar en balanza digital sobre papel aluminio.
- Colocar los componentes en un frasco Erlenmeyer de volumen adecuado y agregar el agua destilada.
- Medir el pH.
- Agregar agar en caso de los medios sólidos.
- Acondicionar para su esterilización en autoclave.
- Conservar en heladera a 4° C hasta su fraccionamiento.

Agar Nutritivo:

- | | |
|---------------------|---------|
| - Extracto de carne | 3 g |
| - Peptona | 5 g |
| - NaCl | 8 g |
| - Agar | 15 g |
| - Agua destilada | 1000 ml |
| - pH | 7.3 |

Parte del medio de cultivo se esterilizará por autoclave para luego ser fraccionado en placas de Petri estériles y parte, se disolverá por calentamiento a baño de María, se distribuirá en tubos y se esterilizarán por autoclave. Luego del proceso de esterilización, los tubos se inclinarán a fin de obtener tubos en “agar pico de flauta” y tubos con “agar inclinado”.